

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 154**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2016 PCT/EP2016/072675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17071889**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2016 E 16777596 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.09.2021 EP 3352777**

54 Título: **Engrailed para su uso en el tratamiento de daños en el ADN en un paciente que padece la enfermedad de Parkinson**

30 Prioridad:

23.09.2015 EP 15306482

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2022

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (25.0%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR;

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%);**

COLLEGE DE FRANCE (25.0%) y

SORBONNE UNIVERSITÉ (25.0%)

72 Inventor/es:

PROCHIANTZ, ALAIN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 895 154 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Engrailed para su uso en el tratamiento de daños en el ADN en un paciente que padece la enfermedad de Parkinson

La presente invención se refiere a la proteína Engrailed o una composición que comprende la proteína Engrailed para su uso en la prevención y/o tratamiento de daños en el ADN en un paciente que padece la enfermedad de Parkinson, en la que dicha proteína Engrailed se inyecta una vez en la región de la sustancia negra pars compacta (SNpc).

Antecedentes de la invención

El estudio de los procesos de envejecimiento es importante, en parte porque muchas enfermedades o afecciones se vuelven más prevalentes entre las personas mayores, por ejemplo, cánceres, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, accidentes cerebrovasculares, glaucoma, enfermedades cardiovasculares, solo por nombrar algunas, entre las cuales muchas aún carecen métodos preventivos o de tratamiento eficaces. Aunque la abundante literatura ha contribuido a la comprensión de los procesos de envejecimiento, la comprensión total de los procesos sigue siendo un desafío importante. Dada la creciente población de personas mayores en todo el mundo y la creciente carga de la atención de la salud y los costos asociados con ella, los estudios de los procesos de envejecimiento que conducen al descubrimiento efectivo de agentes antienvejecimiento para la prevención o el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad son cada vez más importantes.

El ADN celular está bajo constante desafío por estreses genotóxicos exógenos y endógenos (por ejemplo, estrés oxidativo, subproductos tóxicos, función mitocondrial reducida) que modifican el ADN a través de la modificación o la incorporación errónea de bases que resulta en daños en el ADN. Los daños en el ADN son una anomalía física en la estructura del ADN, como roturas monocatenarias o bicatenarias. Los daños en el ADN pueden ser reconocidos por enzimas específicas y, por lo tanto, pueden repararse correctamente a través de la respuesta a daños en el ADN ("DNA Damage Response", DDR). La pérdida de esta capacidad natural de reparación del ADN da como resultado una inestabilidad genética que puede provocar disfunción celular y muerte celular. Además, se ha demostrado que la remodelación de la cromatina y las vías de la DDR están interconectadas, ya que los daños en el ADN inducen cambios en la cromatina, necesarios para dar acceso a la maquinaria de reparación del ADN (Soria *et al.*, 2012, Mol. Cell, 46, 722-734).

La acumulación de daños en el ADN se ha relacionado con el proceso de envejecimiento y la aparición de enfermedades relacionadas con la edad, incluidos trastornos neurodegenerativos, como ataxias, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedades de Huntington y Parkinson (Canugovi *et al.*, 2013, 12, 578-587; Madabhushi *et al.*, 2014, Neuron, 83, 266-282).

Además, en los trastornos neurodegenerativos, como la isquemia y la enfermedad de Alzheimer, las neuronas manifiestan una actividad del ciclo celular aberrante, expresan marcadores del ciclo celular como la ciclina-A y experimentan un grado limitado de remodelación del ADN. Este comportamiento es notable considerando que, en los seres humanos, las neuronas se diferencian de manera terminal durante el desarrollo y permanecen inactivas durante décadas antes del inicio de estos acontecimientos. Si bien los mecanismos subyacentes son poco conocidos, múltiples líneas de evidencia sugieren que estas actividades desempeñan un papel temprano y contribuyente en la muerte neuronal (Andorfer *et al.*, 2005, J. Neurosci., 1, 25, 5446-54).

Además, se ha demostrado que dichos daños en el ADN y el reingreso al ciclo celular pueden constituir una vía común en la apoptosis en enfermedades neurológicas (Kim y Tsai, 2009, Ann. NY ACAD Sci., 1170, 674-9; o Pizarro *et al.*, 2009, Free Radic. Res., 43, 985-994).

Por lo tanto, existe una gran necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos que estimulen la reparación del ADN, que sean capaces de prevenir y/o tratar los daños en el ADN y/o los trastornos relacionados con el envejecimiento celular y/o regular el ciclo celular.

Las homeoproteínas, o proteínas de homeodominio, son factores de transcripción que desempeñan un papel importante en los procesos de migración y diferenciación celular implicados en la morfogénesis. Se caracterizan por la presencia de una secuencia de 60 aminoácidos, el homeodominio, que es un dominio de unión al ADN con una estructura de hélice/vuelta/hélice. Se ha demostrado que el dominio aislado de la proteína Antennapedia de *Drosophila* atraviesa la membrana de neuronas en cultivo, se acumula en el núcleo y estimula el crecimiento de neuritas (documento EP0485578). El homeodominio está altamente conservado y confiere la propiedad de internalización a un gran número de homeoproteínas (Spatazza *et al.*, 2013, Pharmacol. Rev., 65, 90-104).

Las proteínas Engrailed (Engrailed-1 y Engrailed-2) son homeoproteínas con actividad biológica similar que se designan colectivamente en lo sucesivo con el término general Engrailed (EN para humanos o En1/2 para ratones). En recién nacidos y adultos, Engrailed se expresa en células granulares cerebelosas y en núcleos dopaminérgicos mesencefálicos (DA), incluida la sustancia negra pars compacta (SNpc, que degenera en la enfermedad de Parkinson) y el área ventral tegmental (VTA). La En1/2 desempeña un papel importante en el desarrollo del mesencéfalo y, en el mesencéfalo, de las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas (mDA) (Joyner, 1996, Trends Genet., 12, 15-20). La En1/2 también desempeña un papel redundante en la supervivencia de las neuronas adultas mDA que se encuentran en la SNpc y el VTA en la parte ventral del mesencéfalo (Alberi *et al.*, 2004, Development, 131, 3229-3236), por lo que

se propuso para prevenir o tratar la pérdida de neuronas DA en la enfermedad de Parkinson. En el documento WO 2013/128239, se informó de que la administración local de En1/2 por infusión en el mesencéfalo aumenta la síntesis de DA por las neuronas DA y la actividad motora asociada. Prochiantz *et al.* (2011, FEBS Letters, 278, 52 (resumen, Brunet *et al.*, Nature, 438: 94-98, 2005; y Álvarez-Fisher *et al.*, Nature Neurosci., 14: 1260-1266, 2011) han informado que Engrailed no solo es un factor de transcripción, sino también un regulador de traducción que potencia la traducción de los ARNm mitocondriales transcritos en el núcleo, y se demostró que la transducción de Engrailed sobreexpone la traducción de Ndufs1 y Ndufs3, dos proteínas del complejo mitocondrial I y aumenta la síntesis de ATP (ver también Álvarez-Fischer *et al.*, 2011, Nature Neuroscience, 14, 1260-1266; Stettler *et al.*, 2012). Como alternativa, en el documento WO 2007/099227, se demostró que la administración sistémica de En1/2 a ratones induce un aumento en el recambio de DA en el cuerpo estriado, reflejado por un aumento en la producción del metabolito de DA ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) sin modificación de los niveles de dopamina. En Álvarez-Fischer *et al.*, 2011, se demostró que Engrailed protege las neuronas mDA en tres modelos de ratón de la enfermedad de Parkinson.

Otx2 (homólogo de ortodentícula 2) es otra homeoproteína que contiene un homeodominio de tipo bicoide (Simeone *et al.*, 1993, EMBO J, 12, 2735-2747). Pertenece a la familia de proteínas Otx, que desempeña un papel fundamental durante la embriogénesis cerebral (Acampora *et al.*, 1995; Simeone *et al.*, 2002). También se ha demostrado que Otx2 participa en la formación de la retina y en la supervivencia y fisiología de las células ganglionares de la retina adultas (Bernard *et al.*, 2013; Torero Ibad *et al.*, 2011). Por tanto, se ha propuesto la utilización de las homeoproteínas de la familia de los bicoides, en particular de la familia Otx, tal como Otx2, para mejorar la supervivencia de las neuronas ganglionares retinianas (RGC) adultas en cultivo *in vitro*, y también para prevenir o tratar, *in vivo*, la regeneración de las RGC (documento WO 2009/106767).

Los inventores han demostrado ahora que las homeoproteínas pueden proteger a las células de los daños en el ADN y la remodelación de la cromatina, disminuir el número de roturas de la cadena de ADN, restablecer todas las marcas de heterocromatina nucleares y nucleolares, regular el ciclo celular y proteger la célula contra el envejecimiento. excitotoxicidad, incluida la apoptosis. En particular, demostraron que Engrailed, cuando se administra en la región SNpc, es capaz de reparar los daños que conducen a la muerte celular provocada por un fuerte estrés oxidativo. En particular, activan las vías antiapoptóticas y estimulan la supervivencia a largo plazo al restablecer las marcas de heterocromatina, incluida la integridad del nucleolo, y al abolir las roturas de doble cadena en un modelo de estrés oxidativo agudo. Estos resultados permiten proponer el uso de las homeoproteínas, y en particular Engrailed, en patologías en las que se producen daños en el ADN, como en la enfermedad de Parkinson.

Según la presente invención, la expresión "daños en el ADN" cubre colectivamente los daños en el ADN, las roturas en cadenas de ADN (monocatenario y bicatenario) y la alteración de la heterocromatina nuclear y nucleolar.

La invención se define en las reivindicaciones 1 a 4.

La invención se refiere a la proteína Engrailed para su uso en el tratamiento y/o prevención de los daños en el ADN en un paciente que padece la enfermedad de Parkinson, en la que dicha proteína Engrailed se inyecta una vez en la región de la sustancia negra pars compacta (SNpc).

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende la proteína Engrailed para su uso en el tratamiento y/o prevención de los daños en el ADN en un paciente que padece la enfermedad de Parkinson, en la que dicha composición se inyecta una vez en la región de la sustancia negra pars compacta (SNpc).

En una realización, la invención se refiere a una composición para su uso como se define anteriormente, en la que dicha composición comprende otro medicamento farmacéutico seleccionado en el grupo de factor de crecimiento, azúcar complejo y sirtuina.

En una realización, la invención se refiere a una composición para su uso como se define anteriormente, en la que dicho azúcar complejo es ácido polisialico.

La presente descripción (pero no las reivindicaciones) se refiere al uso de al menos una homeoproteína, o derivados peptídicos de la misma, para el tratamiento o la prevención de los daños en el ADN y/o el envejecimiento celular. La descripción (pero no las reivindicaciones) se refiere, además, al uso de al menos una homeoproteína, o derivados peptídicos de la misma, para el tratamiento o la prevención de afecciones asociadas con daños en el ADN y/o el envejecimiento celular, y más particularmente para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con daños en el ADN y enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

La presente descripción (pero no las reivindicaciones) se refiere al uso de un vector recombinante que codifica dichas proteínas o péptidos para el tratamiento o la prevención de los daños en el ADN y/o el envejecimiento celular y para el tratamiento o prevención de afecciones asociadas con los daños en el ADN y/o el envejecimiento celular, y más particularmente, para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con los daños en el ADN y enfermedades o trastornos relacionados con la edad.

Tal como se usan en este documento, el término "homeoproteína" y la expresión "proteínas de homeodominio" son sinónimos y se refieren a productos génicos, proteínas y polipéptidos habitualmente conocidos con estas denominaciones en la técnica. El término y la expresión abarcan tales productos génicos, proteínas y polipéptidos de

cualquier organismo donde se encuentren, y particularmente de animales, preferiblemente vertebrados, más preferiblemente mamíferos, incluidos mamíferos no humanos, e incluso más preferiblemente de humanos. Más particularmente, "homeoproteína" se refiere a una proteína que comprende un homeodominio. Las homeoproteínas incluyen homeoproteínas naturales y homeoproteínas recombinantes o homeoproteínas sintéticas.

- 5 La presente invención incluye la proteína Engrailed nativa, incluidas las variantes alélicas de la misma. La proteína Engrailed de la presente invención comprende el homeodominio de longitud completa.

Las variantes adecuadas de proteína Engrailed para su uso en la presente invención son biológicamente activas y retienen al menos una de las actividades descritas en este documento en relación con la correspondiente homeoproteína nativa. Preferiblemente, se conserva el efecto sobre los daños en el ADN y/o la alteración de la cromatina, aunque una función determinada de la proteína grabada nativa puede verse afectada positiva o negativamente hasta cierto grado, por ejemplo, con variantes que presentan una actividad biológica reducida.

La proteína Engrailed para su uso según la invención se puede preparar mediante las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, en particular mediante la expresión de un ADN recombinante en un sistema celular adecuado (eucariota o procariota) o por síntesis en fase sólida o líquida. Más específicamente, la proteína Engrailed se produce generalmente a partir de un polinucleótido de ADN que comprende una secuencia que codifica la proteína, obtenida por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, incluida la amplificación de una secuencia nucleica por PCR o RT-PCR, selección de bibliotecas de ADN genómico mediante hibridación con una sonda homóloga, o también síntesis química total o parcial. Los vectores recombinantes se construyen e introducen en células huésped mediante técnicas de ingeniería genética y ADN recombinante convencionales, que son conocidas en la técnica. El polinucleótido de ADN se clona en un vector de expresión eucariota o procariota y la proteína producida en las células modificadas con el vector recombinante se purifica por cualquier medio adecuado, en particular por cromatografía de afinidad. El péptido suele sintetizarse en fase sólida, según la técnica Fmoc, descrita originalmente por Merrifield *et al.* (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149-2154) y se purifica por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa.

- 25 Según una realización más preferida, el término y la expresión designan proteínas y polipéptidos que comprenden la siguiente secuencia de aminoácidos (homeodominio) RRRKRTA-YTRYQLE-LEKEFLF-NRYLTRRRRIELAHSL-NLTERHIKIWFQN-RRMK-WKKEN [los sitios de inserción típicos se indican con guiones] (SEQ ID NO:1) (ver <http://homeobox.biosci.ki.se/>).

Entre los ejemplos de homeoproteínas que se pueden utilizar se incluyen todas las homeoproteínas expresadas en diferentes subconjuntos de neuronas adultas, tales como: proteínas Engrailed (Engrailed-1 o Engrailed-2) y las homeoproteínas de la familia de los bicoides (no reivindicadas, pero incluidas solo como ilustración), en particular, la subfamilia Otx, tal como Otx2, proteínas de la familia apareada (Pax), la familia Lhx, por ejemplo Lhx9 y Gbx2.

Las secuencias de genes de homeoproteína y las secuencias de aminoácidos deducidas son bien conocidas en la técnica y están disponibles en las bases de datos de secuencias.

- 35 Un ejemplo de proteína o polipéptido En1/2 incluye, sin limitación, la proteína o polipéptido En1/2 de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos primaria (SEQ ID NO:2):

musEn1: NP_034263 (401aa)

MEEQQPEPKSQRDSGLGAVAAAAAPSGLSLSLSPGASGSSGSDGDSVPVSPQPAPPSPPAAPCLPPLAHH
PHLPPHPPPPPPPPPPQHLLAAPHQPPAAQLHRTTNFFIDNLRPDPFGCKKEQPLPQLLVASAAAGG
GAAAGGSRVERDRGQTGAGRDPVHSLGTRASGAASLLCAPDANCPPDGSQPATAVGAGASKAGNP
AAAAAAAAAAAAAAVAAAAAASKPSDSGGSGGNAGSPGAQGAKEFPEHNPAILLMGSANGGPVVK
TDSQQPLVWPAWVYCTRYSDRPSSGPRTKRLKKKKNEKDKRPRTAFTAEQLQRLKAQEFQANRYITEQR
RQTLAQELSLNESQIKIWFQNKRAKIKKATGIKNGLLALHMAQGLYNHSTTTVQDKDESE

- Un ejemplo de proteína o polipéptido Gbx2 incluye, sin limitación, la proteína o polipéptido Gbx2 de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos primaria (SEQ ID NO:3) (no reivindicado):

musGbx2: NP_034392 (variante más larga, 348aa)

MSAFAFPPLMMMQRPLGSSTAFSIDSLIGSPQPSPGHFVYTGYPMFMPYRPVVLPPPPPPPPALPQAA
LQPALPPAHPHHQIPSLPTGFCSSLAQGMALTSTLMATLPGGFSASPQHQAARFAPQPLPGGGNF
DKAEALQADAEDGKAFLAKEGSLAFAAAEAVQASLVGAVRGQGKDESKVEDDPKGKEESFSLESDVDYS
SDDNLPGQTAHKEEDPGHALEETPQSGGAAGSTTSTGKNRRRRRTAFTSEQLLEKEFHCKKYLSTERSQ
IAHALKLSEVQVKIWFQNRRAKWKRVKAGNANSKTGEPNRNPKIVVPIPVHVSRAIRSQHQQLQEQARP

Un ejemplo de proteína o polipéptido Lhx9 incluye, sin limitación, la proteína o polipéptido Lhx9 de ratón que tiene la secuencia de aminoácidos primaria (SEQ ID NO:4) (no reivindicado):

musLhx9: NP_001036042 (variante más larga, 397aa)

MEIVGCRAENNSCPFRPPAMLFHGISGGHIQGIMEEMERRSKTEARLTGQTQLNGRDAGMPPLSPEKPA
LCAGCGGKISDRYLLAVDKQWHLRCLKCCECKLALESELTCFAKDGSYCKEDYYRRFSVQRCARCHLGIS
ASEMVMRARDSVYHLSCFTCSTCNKTLTTGDHFGMKDSLVCRAHFETLLQGEYPPQLSYTELAAGSGGL
ALPYFNGTGTQKGRPRKRKSPALGVDIVNYSNGCNEADHLDRDQQPYPPSQKTKRMRTSFKHHQL
RTMKSYFAINHNPDAKDLK

- 5 Un ejemplo de proteína o polipéptido En1 incluye, sin limitación, la proteína o polipéptido EN1 humano que tiene una secuencia de aminoácidos primaria como se indica en el número de registro de Genbank AAA 53502.2 o NCBI NP_001417.3.

- 10 Un ejemplo de proteína o polipéptido En2 incluye, sin limitación, la proteína o polipéptido EN2 humano que tiene una secuencia de aminoácidos primaria como se indica en el número de registro de Genbank AAA 53504.2 o NCBI NP_001418.2.

Un ejemplo de proteína o polipéptido Gbx2 (no reivindicado) incluye, sin limitación, la proteína o polipéptido Gbx2 humano que tiene una secuencia de aminoácidos primaria como se indica en el número de registro de Genbank EAW71084.1.

- 15 Un ejemplo de proteína o polipéptido Lhx9 (no reivindicado) incluye, sin limitación, la proteína o polipéptido Lhx9 humano que tiene una secuencia de aminoácidos primaria como se indica en el número de registro de Genbank NP_001014434.1 o NP_064589.2.

- 20 Según la invención, la homeoproteína es una proteína Engrailed (Engrailed-1 o Engrailed-2). El dominio fusionado puede proceder de la proteína Engrailed. El dominio represor de Engrailed puede ser el dominio situado desde las posiciones 1 a 298 de la secuencia de aminoácidos de Engrailed-1 o un subdominio del mismo, tal como el dominio eh1 (posiciones 46 a 67 de la secuencia de aminoácidos de Engrailed-2).

Según otra realización preferida de la invención, dicha homeoproteína es una homeoproteína de un vertebrado.

- 25 La homeoproteína para su uso según la invención es capaz de proteger las células *in vivo* de los daños en el ADN, en particular las roturas de la cadena de ADN, en particular las roturas de ADN bicatenario ("DNA double strand breaks", DSB), la formación y la remodelación de la cromatina, en particular la relajación de la cromatina, especialmente aquellas que son inducidas por factores de estrés o envejecimiento. Los factores de estrés se refieren en particular al estrés oxidativo o ecotóxico.

El efecto de la homeoproteína hacia los daños en el ADN no se limita a las neuronas o un tipo particular de neurona (por ejemplo, neuronas DA mesencefálicas o RGC) y, por lo tanto, puede aplicarse a otro tipo de células, como por ejemplo neuronas motoras, fibroblastos, células epiteliales.

- 30 Los siguientes ejemplos no son según la invención y se presentan solo con fines ilustrativos.

- 35 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "trastornos relacionados con daños en el ADN" incluye trastornos y enfermedades neurodegenerativas, como cáncer, envejecimiento y otros trastornos causados por daños en el ADN debidos a la exposición al estrés oxidativo, carcinógenos, toxinas, radicales libres, tales como radicales oxígeno, o radiación que daña al ADN, tal como radiación ionizante y radiación ultravioleta. Aunque no se requiere una comprensión del mecanismo para la práctica de la invención, se cree que la administración de la homeoproteína según la presente invención previene los daños en el ADN, inhibe los efectos de los daños en el ADN, reduce el número de roturas de las cadenas de ADN y/o estimula una respuesta de reparación celular frente a los daños en el ADN.

- 40 Los daños en el ADN pueden tomar la forma de una disfunción cromosómica, tales como roturas de la cadena de ADN, o una modificación química del ADN (por ejemplo, alquilación). Según una realización preferida, los daños en el ADN significan roturas de las cadenas de ADN, incluidas roturas monocatenarias y bicatenarias, preferiblemente roturas bicatenarias.

- 45 Según la invención reivindicada, la expresión "trastornos relacionados con daños en el ADN" se refiere a las enfermedades de Parkinson. Sin embargo, la característica patológica importante son los daños en el ADN. Por tanto, suprimir o limitar los daños en el ADN y/o disminuir la cantidad de roturas de la cadena de ADN proporciona un método para disminuir la muerte celular neuronal y/o tratar/prevenir los trastornos neurológicos asociados con los daños en el ADN.

El siguiente aspecto no es según la invención y se presenta solo con fines ilustrativos.

En otro aspecto, la descripción ilustra un método para tratar un trastorno relacionado con los daños en el ADN en un sujeto, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una composición que comprende al menos una homeoproteína, o derivados peptídicos de la misma, o un vector recombinante que codifica dicha proteína, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Tal como se usa en este documento, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los vehículos, disolventes, diluyentes, excipientes, adyuvantes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos y agentes retardadores de la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica.

- 10 La composición de la invención se tampona de modo adecuado para que sea apropiada para el uso en seres humanos a un pH fisiológico o ligeramente básico (por ejemplo, de aproximadamente pH 7 a aproximadamente pH 9). Los tampones adecuados incluyen, sin limitación, tampón fosfato (por ejemplo, PBS), tampón bicarbonato, tampones HEPES y PIPES y/o tampón Tris. La composición de la invención puede comprender además un diluyente apropiado para un uso en seres humanos o animales. Es preferiblemente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y tiene una fuerza iónica relativamente baja. Los ejemplos representativos incluyen agua estéril, disolución salina fisiológica (por ejemplo, cloruro de sodio), disolución de Ringer, disoluciones de glucosa, trehalosa o sacarosa, disolución de Hank y otras disoluciones salinas acuosas fisiológicamente equilibradas (ver, por ejemplo, la edición más actual de Remington: The Science and Practice of Pharmacy, A. Gennaro, Lippincott, Williams & Wilkins). Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluidos en la composición de la invención también deben permitir la conservación de su estabilidad en las condiciones de fabricación y almacenamiento a largo plazo (es decir, al menos un mes, con preferencia durante al menos un año) en congelación (por ejemplo, -70°C, -20°C), en refrigeración (por ejemplo, 4°C) o a temperatura ambiente. Se pueden usar excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales para proporcionar propiedades deseables, que incluyen, por ejemplo, modificar o mantener el pH, osmolaridad, viscosidad, transparencia, color, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución de la formulación), modificar o mantener la liberación o absorción en el ser humano, u organismo animal, estimular el transporte a través de la barrera sanguínea o la penetración en un órgano en particular (por ejemplo, el cerebro).

- 25 Tal como lo entiende una persona experta en la técnica médica, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a la gestión médica de una enfermedad, trastorno o afección de un sujeto (es decir, un paciente). En general, una dosis y un régimen de tratamiento apropiados proporcionan la homeoproteína en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. El beneficio terapéutico para los sujetos a los que se les administra la homeoproteína descrita en el presente documento incluye, por ejemplo, un resultado clínico mejorado, en el que el objetivo es prevenir o retrasar o retrasar un cambio fisiológico no deseado asociado con la enfermedad, o prevenir o retrasar o retrasar la expansión o la gravedad de dicha enfermedad. Tal como se analiza en este documento, la eficacia de una o más homeoproteína(s) puede incluir resultados clínicos beneficiosos o deseados que comprenden, pero no se limitan a la mitigación, la disminución o el alivio de los síntomas provocados o asociados con la enfermedad que se va a tratar; la disminución de la aparición de síntomas; mejorar la calidad de vida; un estado libre de enfermedad más prolongado (es decir, disminución de la probabilidad o la propensión de que un sujeto presente síntomas sobre la base de los cuales se realiza el diagnóstico de una enfermedad); la reducción de la extensión de la enfermedad; un estado de enfermedad estabilizado (es decir, sin empeoramiento); el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad; la mejora o la paliación del estado de enfermedad; y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable; y/o la supervivencia global. La eficacia de la homeoproteína descrita en el presente documento también puede significar una prolongación de la supervivencia celular, más particularmente de las neuronas, en comparación con la supervivencia celular esperada si un sujeto no estuviera recibiendo la homeoproteína según la invención.

- 40 Los sujetos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya padecen la enfermedad o trastorno, así como sujetos propensos a tenerlos o que están en riesgo de desarrollar la enfermedad o trastorno, y aquellos en los que la enfermedad, afección o trastorno debe tratarse de manera profiláctica. Un sujeto puede tener predisposición a desarrollar una enfermedad o trastorno que se beneficiaría del método de la invención o puede tener una cierta edad en la cual recibir el método de la invención proporcionaría un beneficio clínico que retrasaría el desarrollo o reduciría la gravedad de una enfermedad, incluidos una enfermedad o trastorno relacionado con daños en el ADN y/o una enfermedad o trastorno relacionado con la edad.

- 50 La dosis de la homeoproteína según la invención para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con los daños en el ADN y/o una enfermedad o trastorno relacionado con la edad puede depender del estado del sujeto, es decir, el estadio de la enfermedad, la gravedad de los síntomas causados por la enfermedad, el estado de salud general, así como edad, sexo y peso, y otros factores evidentes para un experto en la técnica médica. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de una manera apropiada para la enfermedad que se va a tratar, según lo determinen los expertos en la técnica médica. Además de los factores descritos en el presente documento y anteriormente relacionados con el uso de homeoproteína para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con daños en el ADN y/o una enfermedad o trastorno relacionado con la edad, la duración y la frecuencia de administración adecuadas de la homeoproteína también pueden ser determinadas o ajustadas mediante factores tales como el estado del paciente, el tipo y la gravedad de la enfermedad del paciente, la forma particular del ingrediente activo y el método de administración. Las dosis óptimas de la homeoproteína generalmente se pueden determinar usando modelos experimentales y/o ensayos clínicos. La dosis óptima puede depender de la masa corporal, el peso o el volumen sanguíneo del sujeto. Por lo general, se prefiere el uso de la dosis mínima que sea suficiente para proporcionar una

terapia eficaz. El diseño y la ejecución de estudios preclínicos y clínicos para una homeoproteína (incluido el tiempo de administración para el beneficio profiláctico) descrita en el presente documento está dentro de la habilidad de una persona experta en la técnica pertinente. Cuando se administran dos o más homeoproteínas, la dosis óptima de cada homeoproteína puede ser diferente, tal como menor que cuando cualquiera de los agentes se administra por sí solo como una terapia de agente único. Típicamente, dicha homeoproteína se puede usar a concentraciones que oscilan entre 0,001 y 100 μM , o más preferiblemente entre 0,005 y 100 μM , ventajosamente entre 0,005 y 10 μM , y en particular ventajosamente entre 0,001 y 0,10 μM . Una cantidad de homeoproteína que se puede administrar por día puede estar, por ejemplo, entre 0,01 mg/kg y 100 mg/kg (por ejemplo, entre 0,1 y 1 mg/kg, entre 1 y 10 mg/kg, entre 10-50 mg/kg, entre 50-100 mg/kg de peso corporal). En otras realizaciones, la cantidad de una homeoproteína que puede administrarse por día está entre 0,01 mg/kg y 1000 mg/kg, entre 100-500 mg/kg o entre 500-1000 mg/kg de peso corporal. Para la inyección intracerebral, la homeoproteína se puede administrar a una dosis comprendida entre 10 pmol y 100 pmol, por ejemplo, a 25 pmol especialmente para *Engrailed*, como se describe en Rekaik *et al.* (2015, Cell Reports). En otra realización, la homeoproteína se puede administrar mediante inyección intraocular, especialmente para *Otx2*.

La dosis óptima (por día o por ciclo de tratamiento) puede ser diferente para la enfermedad o trastorno relacionado con los daños en el ADN y/o la enfermedad o trastorno relacionado con la edad que se va a tratar y también puede variar según la vía de administración y/o el régimen de tratamiento.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables son los usados convencionalmente.

Por tanto, la invención se refiere a la proteína *Engrailed* para su uso en el tratamiento o prevención de los daños en el ADN en un paciente que padece la enfermedad de Parkinson, en la que *Engrailed* se administra una vez en la región SNpc de un sujeto que lo necesita.

Además, la administración de la homeoproteína se puede combinar con una terapia no farmacológica. Por ejemplo, se puede combinar con la estimulación del núcleo subtalámico para tratar la enfermedad de Parkinson.

Además de las disposiciones anteriores, la descripción también ilustra otras disposiciones, que surgirán de la descripción, que se refiere a realizaciones ejemplares, con referencia a las figuras, en las que:

Figura 1. Expresión alterada de daños en el ADN y marcas de heterocromatina en ratones *En1+/-*

(A) Los genes expresados diferencialmente en neuronas TH+ de la SNpc de *En1+/-* que pertenecen a los grupos de daños en el ADN, remodelación de la cromatina y apoptosis se clasifican por los valores de p.

(B) Las neuronas TH+ en la SNpc de ratones wt ("wild type", tipo natural) muestran un solo anillo de tinción γ -H2AX; Las neuronas TH+ de *En1+/-* muestran focos de γ -H2AX adicionales dispersos en el núcleo. Barra de escala, 10 μm .

(C) El porcentaje de neuronas TH+ con > 2 focos de γ -H2AX en la SNpc aumenta de 2% en peso a 16% en ratones *En1+/-* de 8 semanas de edad ($n = 3$; ensayo de la t de Student). Tinción de γ -H2AX en neuronas TH+ en el VTA de ratones *En1+/-* y wt es similar. Se contaron entre 110 y 162 neuronas en cada condición.

(D) La tinción perinucleolar y perinuclear de H3K27me3 disminuye en las neuronas mDA de SNpc de *En1+/-*. Barra de escala, 10 μm .

(E) La tinción perinucleolar de H3K27me3 se cuantifica midiendo la intensidad de la fluorescencia (izquierda) a lo largo de las líneas de puntos. El porcentaje de células con tinción densa cae (derecha) en ratones *En1+/-* ($n = 3$; ensayo de la t de Student; 129 y 159 neuronas contadas en ratones wt y *En1+/-*, respectivamente).

(F) La tinción perinuclear de H3K27me3 en neuronas TH+ de *En1+/-* se reduce como se muestra por la disminución de las intensidades de fluorescencia de la lámina nuclear/nucleoplasma ($n = 3$; ensayo de la t de Student; 30 y 30 neuronas contadas en condiciones simuladas y 6-OHDA).

(G) Cuantificación superficial de regiones densas en DAPI. La distribución de la frecuencia indica un desplazamiento hacia áreas más pequeñas densas en DAPI en ratones *En1+/-* ($n = 162$ -211; ensayo de Kolmogorov-Smirnov; se analizaron 3 ratones wt y *En1+/-*). Ver también la figura S1 y la tabla S1.

Figura 2. Daños en el ADN y alteración de la cromatina en neuronas TH+ de SNpc tras la inyección de 6-OHDA

(A, B) 6-OHDA inyectado en la SNpc de ratones wt conduce 6 h más tarde a la aparición de focos de γ -H2AX en aproximadamente el 25% de las neuronas TH+ ($n = 3$ -6; ensayo de la t de Student). Los ratones *En1+/-* son más sensibles y el 50% de las neuronas muestran múltiples focos de γ -H2AX ($n = 3$ -6; ensayo de la t de Student; 130, 210 y 146 neuronas contadas para cada condición, respectivamente). Barra de escala, 10 μm . La inyección de 6-OHDA provoca la pérdida de aproximadamente el 30% y el 60% de las neuronas TH+ en ratones wt y *En1+/-*, respectivamente ($n = 3$; ensayo de la t de Student). Se toma como referencia el lado contralateral no inyectado. En cada condición se contaron entre 1534 y 2034 neuronas.

(C) Secciones de mesencéfalo teñidas para γ -H2AX, H3K27me3 y TH y analizadas por microscopía confocal. La tinción perinucleolar y perinuclear de H3K27me3 disminuye tras la inyección de 6-OHDA. Los ratones se analizaron 6 h después de la inyección. Barra de escala, 10 μ m.

5 (D) El porcentaje de neuronas TH+ que muestran tinción perinucleolar y perinuclear de H3K27me3 densa cuantificada como en las figuras 1E,F cae drásticamente (izquierda) en ratones inyectados con 6-OHDA ($n = 3$; ensayo de la *t* de Student; 148 y 91 neuronas contadas en condiciones simuladas y 6-OHDA, respectivamente). La tinción perinuclear de H3K27me3 en neuronas TH+ también disminuye con la inyección de 6-OHDA (derecha) ($n = 3$; ensayo de la *t* de Student; 40 y 47 neuronas contadas en condiciones simuladas y 6-OHDA, respectivamente).

10 (E) Secciones de mesencéfalo teñidas para γ -H2AX, nucleolina y TH y analizadas por microscopía confocal. La localización nucleolar de nucleolina en ratones inyectados de forma simulada se pierde 6 h después de la inyección de 6-OHDA. NCL, nucleolina. Barra de escala, 10 μ m.

(F) El porcentaje de neuronas TH+ con nucleolina nucleolar disminuye significativamente tras la inyección de 6-OHDA ($n = 3$; ensayo de la *t* de Student; se contaron 161 y 97 neuronas en condiciones simuladas y 6-OHDA, respectivamente). NCL, nucleolina.

15 (G) El ARNr pre-45S analizado por qRT-PCR está sobreexpresado después de la inyección de 6-OHDA en núcleos purificados de SNpc ($n = 3$; ensayo de la *t* de Student).

20 (H) Las secciones del mesencéfalo (de animales de 1 año) teñidas para nucleolina y TH se analizaron mediante microscopía confocal. La nucleolina presenta una localización nucleolar en las neuronas TH+ de ratones wt, mientras que el 40% de las neuronas TH+ en los ratones *En1*^{+/-} presenta un patrón de tinción difusa (flechas). Barra de escala, 50 μ m. Las imágenes de mayor aumento de áreas cuadradas punteadas se muestran en los paneles más a la derecha. Barra de escala, 10 μ m. El porcentaje de neuronas TH+ con nucleolina nucleolar se reduce significativamente en ratones *En1*^{+/-} ($n = 3$; ensayo de la *t* de Student; 99 y 87 neuronas contadas en ratones wt y *En1*^{+/-}, respectivamente). NCL, nucleolina. Ver también la figura S2.

Figura 3. Engrailed rescata las células TH+ de la muerte celular inducida por 6-OHDA

25 (A) Los ratones inyectados con 6-OHDA en la SNpc se volvieron a inyectar 30 minutos más tarde con una simulación o con En2 y se analizaron a las 24 h. En comparación con la simulación, la inyección de En2 previene la pérdida de células TH inducida por 6-OHDA en la SNpc ipsilateral. Barra de escala, 500 μ m.

30 (B) Efecto protector de En2 evaluado por la proporción de recuentos de células TH+ en SNpc ipsilateral frente a contralateral 6 h, 24 h y 7 días después de la inyección ($n = 3-5$; ensayo de la *t* de Student). El número de neuronas contadas osciló entre 1670 y 2275 por condición.

(C) El rescate de neuronas TH+ por En2 en ratones inyectados con 6-OHDA es paralelo a la desaparición de ciclina A a las 24 h. Barra de escala, 100 μ m.

35 (D) La inmunotinción para H3K27me3 muestra una recuperación progresiva después de la inyección de En2. La recuperación de la nucleolina nucleolar es casi completa a las 24 h. El porcentaje de neuronas TH+ con focos de γ -H2AX vuelve a la normalidad entre 24 horas y 7 días después de la inyección. Para cada análisis, $n = 3$. ANOVA de una vía seguida del ensayo de Dunnett (frente al simulacro). El número de neuronas contadas osciló entre 102 y 150 para cada condición.

(E) La expresión de genes seleccionados relacionados con la apoptosis y el ciclo celular en la SNpc de ratones 6-OHDA/simulacro y 6-OHDA/En2 analizados 6 h después de las inyecciones ($n = 5$; ensayo de la *t* de Student).

40 (F) Otx2 protege las neuronas TH+ contra la muerte celular inducida por 6-OHDA. Se inyectó Otx2 30 minutos después de la inyección de 6-OHDA y los ratones se analizaron 24 horas después. El efecto protector se evaluó del mismo modo que para las inyecciones de En2 ($n = 3$; ensayo de la *t* de Student). El número de neuronas contadas osciló entre 1268 y 1495 para cada condición. Ver también la figura S3.

Figura 4. El análisis de secuenciación del ARN revela actividad anti-apoptótica de Engrailed

45 (A, B) Los genes expresados diferencialmente en la SNpc de 6-OHDA frente a 6-OHDA/En2 relacionados con los daños en el ADN, la remodelación de la cromatina, la apoptosis y el ciclo celular se clasifican por los valores de *p*.

(C) La expresión de genes seleccionados en la SNpc de 6-OHDA y 6-OHDA/En2 se confirma mediante qRT-PCR ($n = 5$; ensayo de la *t* de Student).

50 (D) Panel izquierdo: Los transcritos de *Gadd45b* y *Pml* se midieron mediante qRT-PCR en la SNpc de 6-OHDA y 6-OHDA/En2 a las 6 h (inyección con cicloheximida, CHX; $n = 5$; ensayo de la *t* de Student). Panel derecho: Los transcritos de *Gadd45b* en la SNpc ratones wt y *En1*^{+/-} de 8 semanas de edad ($n = 4$; ensayo de la *t* de Student).

(E) Secciones de mesencéfalo procedentes de la simulación, 6-OHDA/simulación y 6-OHDA/En2 teñidas para p-JNK y TH y analizadas mediante microscopía confocal. Barra de escala, 50 μ m. Las imágenes de mayor aumento de los cuadrados punteados se muestran en la paneles más a la derecha. Barra de escala, 10 μ m.

5 (F) En2 disminuye significativamente el porcentaje de neuronas TH+ de SNpc con tinción p-JNK (n = 3; ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparaciones múltiples de Tukey; el número de neuronas analizadas osciló entre 227 y 351 para cada condición). Ver también la figura S4.

Figura S1 (relacionada con la figura 1). Expresión de genes alterados en neuronas mDA de ratones *En1*^{+/-}

10 (A) La SNpc procedente de ratones wt y *En1*^{+/-} se microdisecionó con láser para el análisis de secuenciación del ARN. Se indica el número total de lecturas y genes expresados diferencialmente (p <0,05). La disminución de la expresión de *En1* en SNpc de *En1*^{+/-} fue confirmada mediante la secuenciación del ARN.

(B) El análisis de los datos de secuenciación del ARN (Pathway Studio) revela un enriquecimiento significativo (p <0,005) en los subgrupos de genes de ontología implicados en los daños en el ADN y la remodelación de la cromatina entre hermanos de camada wt y *En1*^{+/-}. El análisis que utiliza las vías del proceso celular también mostró una expresión diferencial de genes relacionados con la apoptosis.

15 (C) Análisis de los datos de secuenciación del ARN de experimentos de ganancia de función con Engrailed de Pathway Studio. Se indican los subgrupos de genes enriquecidos (p <0,01) (n = 5).

(D) Los factores de transcripción expresados diferencialmente en el análisis de secuenciación del ARN por Pathway Studio de SNpc de wt y *En1*^{+/-} se clasifican por el valor de p.

20 (E) La expresión alterada de una selección de genes relacionados con los daños en el ADN, la remodelación de la cromatina y la apoptosis se confirma mediante qRT-PCR utilizando ARN de SNpc procedente de ratones wt y *En1*^{+/-} de 6 semanas de edad (n = 3-6; ensayo de la t de Student).

(F) El porcentaje de neuronas TH+ con > 2 focos de γ -H2AX en la SNpc aumenta del 5% en peso al 17% en ratones *En1*^{+/-} de 24 semanas de edad (n = 3; ensayo de la t de Student; se contaron 107 y 94 neuronas en las condiciones de wt y *En1*^{+/-}, respectivamente).

25 (G) Transcritos de LINE-1 en la SNpc de ratones *En1*^{+/-} analizados por un aumento de qRT-PCR, en comparación con wt (n = 5; ensayo de la t de Student).

(H) Se detectan neuronas TH+ positivas para caspasa-3 activadas en la SNpc de ratones *En1*^{+/-} (8 semanas de edad). Barra de escala, 50 μ m.

30 Figura S2 (relacionada con Figura 2). Muerte de células TH y cambios en la cromatina en ratones inyectados con 6-OHDA

(A) El análisis de la transferencia Western muestra una disminución del 50% en los niveles de proteína TH a las 6 h en la SNpc ipsilateral inyectada con 6-OHDA (n = 3).

(B) Los niveles de ARNm para TH y En1 disminuyen (a las 6 h) en un 70 y un 50%, respectivamente, en SNpc inyectada con 6-OHDA (n = 6; ensayo de la t de Student).

35 (C) La caspasa-3 activada se detecta a las 6 h en neuronas TH+ en el lado inyectado con 6-OHDA, pero no en el lado contralateral. Barra de escala, 100 μ m.

(D) La triple inmunotinción de las secciones del mesencéfalo para γ -H2AX, H3K9me3 y TH muestra que la colocalización de H3K9me3 con DAPI en la condición simulada se pierde en ratones inyectados con 6-OHDA. De manera similar, la colocalización de MeCP2 con DAPI en neuronas TH+ de ratones inyectados de forma simulada se pierde en ratones inyectados con 6-OHDA. Barra de escala, 10 μ m.

40 (E) El porcentaje de neuronas TH+ con marcas densas de H3K9me3 o MeCP2 se reduce significativamente en ratones inyectados con 6-OHDA (n = 3; ensayo de la t de Student). El número de neuronas contadas fue 161 (simulado) y 97 (6-OHDA) para H3K9me3, y 150 (simulado) y 128 (6-OHDA) para MecP2.

45 (F) Pérdida de tinción de lámina B2 perinuclear en neuronas TH+ en la SNpc de ratones inyectados con 6-OHDA. Barra de escala, 20 μ m.

(G) Cuantificación superficial de regiones densas en DAPI en neuronas TH+ en ratones con inyección simulada o inyectados con 6-OHDA. En comparación con los controles con inyección simulada, la distribución de las frecuencias relativas indica un desplazamiento hacia áreas más pequeñas densas en DAPI en las neuronas TH+ de los ratones inyectados con 6-OHDA (n = 137-177; ensayo de Kolmogorov-Smirnov; 3 ratones por condición).

(H) Se cuantificaron los ARNm de *p53* y *p21* mediante qRT-PCR usando el ARN total de la SNpc de ratones con inyección simulada o inyectados con 6-OHDA (n = 6; ensayo de la t de Student).

(I) Mayor expresión de elementos repetidos en SNpc inyectada con 6-OHDA. Los niveles de transcritos de LINE-1 analizados por qRT-PCR usando el ARN total de SNpc aumentan en ratones inyectados con 6-OHDA. El nivel de ARN de LINE-1 también se analizó usando ARN de núcleos purificados de SNpc (n = 3-5; ensayo de la t de Student).

Figura S3 (relacionada con las figuras 2-3). Actividad de transcripción de Engrailed implicada en la protección de neuronas TH

(A) Los ratones se infundieron unilateralmente con simulación o EnHD-VP64 en la SNpc y se analizaron a los 7 días. La inmunotinción de secciones del mesencéfalo para TH muestra que la infusión de EnHD-VP64 (pero no la simulación) provoca la pérdida de células TH en la SNpc ipsilateral. Barra de escala, 500 μ m.

(B) La pérdida de células TH inducida por EnHD-VP64 se evaluó comparando la proporción de recuentos de células TH+ en SNpc ipsilateral frente a contralateral a los 7 días después de la infusión (n = 6; ensayo de la t de Student). El número de neuronas contadas osciló entre 1902 y 2118 por condición.

(C) La cuantificación de la tinción de γ -H2AX muestra que el porcentaje de neuronas TH+ con >2 focos de γ -H2AX en la SNpc aumenta con la infusión de EnHD-VP64 (n = 3; ensayo de la t de Student; se contaron 138 y 129 neuronas en las condiciones de simulación simulada y EnHD-VP64, respectivamente).

(D) El análisis de los datos de secuenciación del ARN también revela genes expresados diferencialmente en subgrupos de ontología de Pathway Studio relacionados con la organización nucleolar y la biogénesis en la SNpc de ratones *En1*^{+/-} (p < 0,1).

(E) El nivel de ARNr pre-45S en la SNpc de ratones wt y *En1*^{+/-} (animales de 8 semanas de edad) se analizó mediante qRT-PCR (n = 4; ensayo de la t de Student).

(F) Engrailed estimula la supervivencia de las neuronas TH+ en el modelo 6-OHDA. No se observó el efecto de supervivencia de Engrailed si Engrailed se inyectó 24 h después de la inyección de 6-OHDA (cuando se pierde la mayoría de las neuronas TH+) y se evaluó la recuperación 6 h después (n = 3).

Figura S4 (relacionada con la figura 4). Detección de marcadores del ciclo celular en neuronas TH+ ante un estrés oxidativo agudo *in vivo* y protección mediada por Engrailed frente a DSB inducidas por H₂O₂ *in vitro*.

(A) Detección de los marcadores del ciclo celular PCNA y pH3 en neuronas TH+ en el lado inyectado con 6-OHDA. Barra de escala, 20 μ m.

(B) La inmunotinción de las secciones del mesencéfalo revela neuronas TH+ que expresan ciclina A solo en el lado ipsilateral de ratones inyectados con 6-OHDA. Los ratones se analizaron 6 h después de la inyección. Barra de escala, 100 μ m.

(C) Detección de caspasa-3 activada en neuronas TH+ con tinción positiva para pH3. Barra de escala, 50 μ m.

(D) El porcentaje de neuronas TH+ que expresan ciclina A tras la inyección de 6-OHDA se cuantificó (izquierda, n = 3; ensayo de la t de Student) y se confirmó mediante análisis de la transferencia Western (derecha, n = 4; ensayo de la t de Student).

(E) El tratamiento con Engrailed protege a las neuronas del mesencéfalo frente a DSB inducidas por H₂O₂. Cultivos de neuronas mesencefálicas primarias de embriones de ratón E14.5 se trataron con H₂O₂ a 5 μ M después de una incubación de 24 h con NaCl o En1 (15 nM). Las células se fijaron 1 h después del tratamiento con H₂O₂, se tiñeron para γ -H2AX y se cuantificó el número de focos (n = 68-137; ANOVA de una vía seguido del ensayo de comparaciones múltiples de Tukey). Se evaluó la protección mediada por En2 frente a las DSB inducidas por H₂O₂ usando cultivos de neuronas del mesencéfalo mediante el ensayo cometa realizado según las instrucciones del kit Trevigen CometAssay y se analizó con el complemento OpenComet, barra de escala, 100 μ m. Se cuantificó el número de neuronas con cola de cometa (n = 39-46; ANOVA de una vía seguida del ensayo de comparaciones múltiples de Tukey).

(F) Genes expresados diferencialmente en la SNpc de ratones inyectados con En2 frente a ratones con inyección de simulación. Los genes relacionados con los daños en el ADN, la remodelación de la cromatina y la apoptosis se clasifican por los valores de p.

Figura 5 : En1/GBX2/LHX9

5.1, Respuesta a la dosis para Engrailed; 5.2, respuesta a la dosis para Gbx2; 5.3, Respuesta a la dosis para Lhx9

Ejemplos

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Animales

- 5 Los ratones se trataron según las directrices para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Instituto Nacional de Salud de EE. UU.) y la Directiva europea 86/609 (Consejo de la CEE para la protección animal en la investigación experimental y otros usos científicos). Ratones Swiss OF1 wt (Janvier) y *En1*^{+/-} (Hanks *et al.*, 1995, Science, 269, 679-682) se mantuvieron en instalaciones convencionales para animales. Los grupos experimentales consistieron en ratones de 6 a 9 semanas de edad.

Tratamientos in vivo

- 10 Para las inyecciones de 6-OHDA, los ratones se colocaron en un instrumento estereotáxico y se taladró un orificio de trépano en el cráneo 3,3 mm caudal y 1 mm lateral al bregma. La aguja se introdujo 4 mm desde la superficie del cráneo y se realizaron inyecciones de 6-OHDA (2 µl; 0,8 µg/µl Sigma) o simuladas (NaCl al 0,9%) durante 4 minutos. Este procedimiento dirige la homeoproteína al tejido de la SNpc. Para los experimentos de rescate con Engrailed, una disolución (2 µl) de En2 recombinante bacteriana (300 ng; 4 µM) y ácido colomínico (3 µg) (Sonnier *et al.*, 2007, J. Neurosci., 27, 1063-1071) o vehículo (NaCl al 0,9%) se inyectó 30 min después de la inyección de 6-OHDA usando las mismas coordenadas. Cuando se indica, se añadió cicloheximida (0,1 µg/µl, sigma). Para la inyección de la proteína Otx2, se utilizó una disolución de 2 µl que contenía 300 ng de la proteína. Los ratones se sacrificaron en los momentos indicados para el análisis. Se obtuvieron tejidos de la SNpc para la qRT-PCR y el análisis de la transferencia Western realizando punciones de 1 mm a partir de cortes coronales congelados de 2 mm de espesor.
- 15
- 20 Para EnHD-VP64, los ratones se infundieron durante 7 días con una minibomba osmótica (Alzet 1002, Charles River Laboratories) conectada a una cánula de 4 mm de largo colocada en las mismas coordenadas estereotáxicas que anteriormente. La bomba se llenó con 100 µl que contenían En-VP64 (400 nM, NaCl al 0,9% o el volumen equivalente de un extracto bacteriano que contiene un plásmido vacío) y ácido colomínico (1,5 µg/µl).

Cuantificación de imágenes

- 25 Las imágenes se analizaron con ImageJ. Para la inmunofluorescencia, todas las cuantificaciones se realizaron utilizando un aumento de 60X y planos focales sucesivos de 0,7 µm de espesor. Para el análisis del patrón nucleolar de H3K27me3, se creó un gráfico de las intensidades de los píxeles a lo largo de una línea colocada a través del nucleolo. La relación perinuclear/nuclear de la intensidad de fluorescencia de H3K27me3 se determinó midiendo la densidad de píxeles en la periferia del núcleo y en el nucleoplasma. Se cuantificaron las regiones densas en DAPI en ratones inyectados con 6-OHDA y de forma simulada midiendo las áreas de superficie de DAPI individuales en cada célula TH⁺ y representándolas gráficamente como histogramas de distribución de frecuencia relativa.
- 30

Análisis estadístico

La significancia estadística se determinó usando los ensayos apropiados como se indica. Los datos se expresan como promedio ± MEE. *p <0,5, **p <0,01, ***p <0,001, ****p <0,0001 en todos los experimentos.

- 35 *Análisis de secuenciación del ARN*

- Se aislaron neuronas mDA en la SNpc de ratones wt y *En1*^{+/-} marcados con el protocolo de tinción rápida TH (Chung *et al.*, 2005, Hum. Mol. Genet., 14, 1709-1725) mediante microdissección por captura láser (LMD7000, Leica). Se combinaron muestras de 4 animales por grupo y se extrajo el ARN total usando el kit AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen), seguido de ADNasa I usando el protocolo de RNeasy MinElute Cleanup para el tratamiento con ADNasa I en la columna. La construcción de bibliotecas de ADNc (Ovation RNA-seq System V2) y la secuenciación del ARN con Illumina se realizó mediante la plataforma Ecole Normale Supérieure Genomic (París). Los valores de p de genes expresados diferencialmente entre las muestras de wt y *En1*^{+/-} se calcularon utilizando el paquete DESeq (Anders *et al.*, 2010, Genome Biol., 11, R106). Se inyectaron los recuentos de lectura normalizados en el algoritmo de análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (Pathway Studio, Elsevier) para ensayar el enriquecimiento estadístico. Las colecciones de ontología y vías de proceso celulares de Pathway Studio se seleccionaron como categorías de conjuntos de genes para el análisis. El análisis de secuenciación del ARN también se realizó utilizando ARN extraído de neuronas mDA microdisseccionadas con captura láser después de una infusión de Engrailed (Álvarez-Fischer *et al.*, 2011, Nat. Neurosci., 14, 1260-1266) en la SNpc de ratones wt y de muestras de tejido de SNpc recogidas 6 h después de la inyección de 6-OHDA/simulación y 6-OHDA/En2.
- 40
- 45

- 50 *qRT-PCR*

El ARN total de los tejidos SNpc se extrajo usando el kit RNeasy Lipid Tissue (Qiagen), seguido de una digestión con ADNasa I (Thermo). Se transcribió el ARN (200 ng) utilizando el kit de transcripción inversa QuantiTect (Qiagen). La qRT-PCR se realizó utilizando SYBR-Green (Roche Applied Science) y los valores se normalizaron a *Gapdh* y/o *Hprt*.

Los datos se analizaron mediante el método ddCt. En algunos experimentos, el ARN se aisló específicamente de núcleos de SNpc (kit Subcellular Protein Fractionation Kit, Thermo).

Tabla de métodos complementarios: Lista de cebadores utilizados para el análisis de qRT-PCR

(se refiere a procedimientos experimentales)

Gen	Cebador directo	Cebador inverso
<i>Casp9</i>	TGGCTCCTGGTACATCGAGA SEQ ID NO. 5	AGCATTGGCAACCCTGAGAA SEQ ID NO. 6
<i>CcnA1</i>	GGGCCTGCTCAGGCTGT SEQ ID NO. 7	GTTCTCTGTGGGGGATCCTG SEQ ID NO. 8
<i>CcnA2</i>	CTCGCTGCATCAGGAAGACC SEQ ID NO. 9	TAAGAGGAGCAACCCGTCG SEQ ID NO. 10
<i>Cdk5</i>	GCCAGACTATAAGCCCTACCC SEQ ID NO. 11	GCTGCACAGGGTTACACTTC SEQ ID NO. 12
<i>En1</i>	CCGGTGGTCAAGACTGACTC S EQ ID NO. 13	CTGGTGCGTGGACCAGAG SEQ ID NO. 14
<i>En2</i>	CCTTCTTCAGGTCCCAGGTC SEQ ID NO. 15	AACTCAGCCTTGAGCCTCTG SEQ ID NO. 16
<i>Fen1</i>	ATTCCTCTTCGCCGCCATT SEQ ID NO. 17	GAGGCATCGATGGCCACTTT SEQ ID NO. 18
<i>Gadd45b</i>	TCTCTAGAGGAACGCTGAGACC SEQ ID NO. 19	GTAGGGTAGCCTTTGAGGGATT SEQ ID NO. 20
<i>Hdac7</i>	CCCACCTGTCAGACCCAAGT SEQ ID NO. 21	AGTCATAGACCAGCCCTGTAGCA SEQ ID NO. 22
LINE-1 5'UTR	CTGGGAACTGCCAAAGCAAC SEQ ID NO. 23	CCTCCGTTTACCTTTCGCCA SEQ ID NO. 24
LINE-1 ORF2	AATCGACAAATGGGACCTAATGA SEQ ID NO. 25	GTAAAGATCCTTTCCCAATCTGTTG SEQ ID NO. 26
<i>Nfkb2</i>	GGTGGAAGACAAGGAGGAAG SEQ ID NO. 27	AGGAGGAGAAAAAGCCGAG SEQ ID NO. 28
<i>p21</i> (<i>Cdkn1a</i>)	GGCCCGGAACATCTCAGG SEQ ID NO. 29	A AATCTGTCTCAGGCTGGTCTGC SEQ ID NO. 30
<i>p53</i>	GGCGTAAACGCTTCGAGATG SEQ ID NO. 31	CTTCAGGTAGCTGGAGTGAGC SEQ ID NO. 32
<i>Parp3</i>	GACCCCAGCTTGAAGAGTCC SEQ ID NO. 33	CTGCCCATCCAGTTCGAGTT SEQ ID NO. 34
<i>Phf1</i>	CTATCCGGATGTTGCGCTCC SEQ ID NO. 35	GAGGTGACCTATCTGGGGGT SEQ ID NO. 36
<i>Pml</i>	ATAGCAGCAGTGAGTCCAGC SEQ ID NO. 37	GCTGGCTAATTTTCTGGGTTTCA SEQ ID NO. 38
<i>Polk</i>	CACAGCACTTGCAGGAAAGG SEQ ID NO. 39	CCTGTCTGGGTGTGTCGATT SEQ ID NO. 40
ARNr pre-45S	CGTGTAAGACATTCCTATCTCG SEQ ID NO. 41	GCCCGCTGGCAGAACGAGAAG SEQ ID NO. 42
<i>Rad1</i>	TACTGCTTAGTGGCCAGCCT SEQ ID NO. 43	AGGCATTTGCTTGCACACAC SEQ ID NO. 44
Th	GTAAGTGGACAGTCCTCACACCA SEQ ID NO. 45	GGTGGTACCCTATGCATTTAGC SEQ ID NO. 46
Uaca	AGAGGTCAAGAAGGGCAAGC SEQ ID NO. 47	TGCCACTCAACGCTCTTTCT SEQ ID NO. 48
<i>Xpa</i>	GCGTGGCCAGTGTAAGCA SEQ ID NO. 49	CGCATTCTTCACAGATGGTGT SEQ ID NO. 50

Inmunotinción

Los ratones se perfundieron con paraformaldehído al 4% en PBS, los cerebros se fijaron posteriormente durante 1 h y se crioprotegieron en sacarosa al 15%. Se congelaron tejidos sumergidos en Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek) con isopentano antes de la conservación a -80°C. Los cerebros se cortaron al nivel de la SNpc en secciones de 18 µm de espesor. Para la inmunofluorescencia, las secciones se permeabilizaron en Triton X-100 al 1% en PBS durante 20 min y se incubaron a 100°C durante 20 min en tampón citrato (ácido cítrico 10 mM, Tween 20 al 0,05%, pH 6,0). Después de bloquear durante 1 h (suero de cabra normal al 10%, Triton X-100 al 0,05% en PBS), los tejidos se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios diluidos en la disolución de bloqueo (anti-γ-H2AX de ratón, 1:200, Millipore; anti-TH de pollo, 1:500, Abcam; anti-caspasa3 activada de conejo, 1:200, Abcam; anti-nucleolina de conejo, 1:200, Sigma; anti-fibrilarina de conejo, 1:200, Señalización celular; anti-H3k27me3 de conejo, 1:200, Millipore; anti-H3k9me3 de conejo, 1:200, Abcam; un generoso obsequio de Edith Heard; anti-lamina B2 de conejo, 1:100, Santa Cruz; anti-Mecp2 de conejo, 1:300, Abcam; anti-PCNA de conejo, 1:200, Señalización celular; anti-ciclina A de conejo, 1:200, Santa Cruz; anti-pH3 de ratón, 1:100, Señalización celular; anti-p-JNK de ratón, 1:200, Santa Cruz). Las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios apropiados (488 anti-pollo, 647 anti-pollo, 488 anti-ratón, 546 anti-ratón y 546 anti-conejo Alexa Fluor, Life Technologies) durante 1 h a temperatura ambiente. Se obtuvieron imágenes de las secciones marcadas mediante microscopía confocal (SP5, Leica). Para la inmunohistoquímica de TH, las secciones se permeabilizaron en Triton X-100 al 1% y se incubaron durante la noche a 4°C con suero de cabra normal al 10% en PBS que contenía un anticuerpo policlonal de conejo contra TH (1:1000; Pel-Freez Biologicals). Las secciones se trataron con anticuerpo secundario biotinilado y se incubaron con complejo de peroxidasa de rábano picante biotinilado-avidina (sistema ABC, Vectastain). La peroxidasa se reveló usando el kit de sustrato de peroxidasa DAB (HRP) (Vectastain) y se obtuvieron imágenes con un microscopio Nikon Eclipse i90.

RESULTADOS

Ejemplo 1: Expresión génica de neuronas mDA en la SNpc de ratones *En1*^{+/-}

El análisis de secuenciación del ARN en SNpc microdisseccionada se realizó en ratones wt y *En1*^{+/-}. Se obtuvieron lecturas comparables en ratones wt y *En1*^{+/-} con 989 genes expresados diferencialmente ($p < 0,05$) (figura S1A). El análisis se realizó en animales de 6 semanas de edad cuando todas las neuronas todavía estaban presentes en los ratones *En1*^{+/-}. La ontología de Pathway Studio (análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes, software Pathway Studio) indica que los tres grupos más representados y significativos son la reparación del ADN ($p = 0,002$), la remodelación de la cromatina ($p = 0,004$) y los factores de transcripción ($p = 0,007$); el análisis de las vías de procesos celulares también reveló genes de regulación de la apoptosis diferenciales ($p = 0,01$) (figura S1B). Los genes dentro de estas ontologías y vías se clasificaron por valores de p crecientes; la figura 1A destaca aquellos con diferencias significativas en los números de lectura.

Los genes de factores de transcripción representan el grupo más abundante (figura S1B); la figura S1D clasifica mediante los valores de p aquellos con expresión modificada en ratones *En1*^{+/-}. La infusión de *En2* en la SNpc de ratones wt también modifica los genes de factores de transcripción, pero mucho menos los relacionados con la respuesta a los daños en el ADN y de modificación de la cromatina (figura S1C) que, por lo tanto, se investigaron más a fondo en el contexto de este estudio. Una RT-PCR cuantitativa (figura S1E) confirmó que los ratones *En1*^{+/-} de 6 semanas de edad muestran una expresión alterada de varios genes relacionados con los daños en el ADN, la remodelación de la cromatina y la apoptosis.

Ejemplo 2: Roturas de las cadenas del ADN y marcas de cromatina modificadas en neuronas mDA de *En1*^{+/-}

Se estudiaron las neuronas mDA en la SNpc de ratones *En1*^{+/-} (entre 6-8 semanas de edad) en busca de signos de daños en el ADN siguiendo el marcador de roturas de la cadena del ADN (DSB) γ-H2AX (Lobrich *et al.*, 2010, Cell Cycle, 9, 662-669). Esto reveló la presencia de múltiples focos de γ-H2AX en aproximadamente el 16% de las neuronas TH⁺ en la SNpc (figuras 1B,C). Es de destacar que las DSB no conducen necesariamente a una muerte celular rápida, como lo demuestra la ausencia de una muerte significativa, en el mutante *En1*^{+/-}, entre 24 y 48 semanas a pesar de que el 16% de las células tienen múltiples focos de γ-H2AX a las 24 semanas (figura S1F). En ratones wt, aproximadamente el 98% de las neuronas mDA muestran un solo anillo de γ-H2AX alrededor del nucleolo (figura 1B) también presente en las neuronas de todo el cerebro. En consonancia con la menor sensibilidad de las neuronas mDA del VTA a la pérdida de un alelo *En1*, la tinción de γ-H2AX fue similar en el VTA de ratones wt y *En1*^{+/-} (figura 1C).

Los ratones *En1*^{+/-} también presentan signos de alteración de la cromatina. Como se muestra en las figuras 1D-F, el patrón de tinción perinucleolar y perinuclear de H3K27me3 (histona H3 trimetilada K27) cambia en una fracción significativa de neuronas TH⁺ de *En1*^{+/-}. La distribución de tamaño de las regiones densas en DAPI de heterocromatina (Guenatri *et al.*, 2004, J. Cell. Biol., 166, 493-505) también muestra una reducción en el porcentaje de manchas grandes en el ratón *En1*^{+/-} (figura 1G). Los cambios en la heterocromatina a menudo se asocian con cambios en la expresión de elementos nucleares interdispersos largos ("Long Interdispersed Nuclear Elements", LINE), y, en consecuencia, la expresión de LINE aumenta en la SNpc de los mutantes *En1*^{+/-} (figura S1G). La inducción de genes de apoptosis (figura 1A) se confirma por la tinción conjunta de TH/caspasa-3 activada en la SNpc de ratones *En1*^{+/-}, nunca visto en los hermanos de camada wt (figura S1H).

Ejemplo 3: Sensibilidad mejorada de neuronas mDA de *En1*^{+/-} frente al estrés oxidativo agudo

Se aplicó un estrés oxidativo agudo a las neuronas mDA inyectando 6-OHDA (un fármaco productor de superóxido capturado específicamente por las neuronas mDA) directamente en la SNpc. Esto indujo, en 6 h, la pérdida del 35% de las neuronas TH⁺ y la formación de múltiples focos anómalos de γ -H2AX en aproximadamente el 26% de los restantes. (figura 2A,B), solo en la SNpc ipsilateral. La pérdida neuronal fue paralela a una reducción en la proteína TH y el ARNm (también el ARNm de *En1*) (figuras S2A,B) y la presencia de numerosas neuronas mDA positivas para caspasa 3 activada (figura S2C). La inyección de 6-OHDA en ratones *En1*^{+/-} condujo a un mayor porcentaje de neuronas TH⁺ con focos de γ -H2AX en el lado inyectado con 6-OHDA (51%) y a un aumento paralelo en la pérdida de neuronas TH⁺ (60%) (figura 2A,B). La infusión de EnHD-VP64 de hecho conduce a la muerte celular de mDA (figura S3A, B) y a un aumento en el número de focos de γ -H2AX (figuras S3C).

Ejemplo 4 : El estrés oxidativo induce cambios en las marcas de heterocromatina

Las marcas de heterocromatina también se modifican 6 h después de la inyección de 6-OHDA en ratones wt. La tinción densa perinucleolar y perinuclear de H3K27me3 en las neuronas TH⁺ de ratones inyectados de forma simulada cambia a una tinción nucleoplasmática difusa en ratones inyectados con 6-OHDA (figura 2C). Este cambio se cuantificó en el nucleolo midiendo la intensidad de la fluorescencia perinucleolar a lo largo de un diámetro. (figura 2D, izquierda). De manera similar, la proporción de intensidades de fluorescencia de H3K27me3 entre la lámina nuclear periférica y el estroma nuclear se redujo de 1,4 a 1,0 (figura 2D, derecha). La 6-OHDA aguda también alteró la tinción de H3K9me3 (histona H3 trimetilada K9) y MeCP2 (figura S2D, E), con la pérdida de tinción clara con lamina B2 (figura S2F) y un cambio en la distribución del tamaño de los puntos densos en DAPI (figura S2G). La MeCP2 se une a las CpG metiladas, y los cambios en su tinción podrían reflejar la oxidación de la guanina.

Se verifica el estrés nucleolar, sugerido por la pérdida perinucleolar de γ -H2AX tras 6-OHDA (figura 2A), por la caída del 70% (simulado) al 30% (6-OHDA) de células mDA con tinción densa de nucleolina (figura 2E, F). Este cambio fue acompañado por una fuerte sobreexpresión del ARN ribosómico pre-45S (figura 2G), lo cual indica daño nucleolar. En comparación, la tinción de nucleolina, normal en neuronas TH⁺ de *En1*^{+/-} a las 6 semanas, muestra signos de alteración al año (figura 2H). Sin embargo, la expresión de genes implicados en la organización del nucleolo (secuenciación del ARN) y el análisis de qRT-PCR del ARNr pre-45S sugieren un cambio en la fisiología nucleolar en ratones *En1*^{+/-} de 6-8 semanas de edad (figura S3D,E).

Ejemplo 5: Engrailed disminuye el número de DSB inducidas por H₂O₂

Para verificar si Engrailed es capaz de regular los daños en el ADN inducidos por el estrés oxidativo, se inyectó unilateralmente a ratones wt con 6-OHDA y se les volvió a inyectar 30 minutos después con vehículo (simulado) o En2. Los análisis se realizaron a las 6 h, 24 h o 7 días después de las inyecciones. La dramática pérdida a las 24 h de células TH⁺ en la SNpc de 6-OHDA/inyección simulada se reduce mucho en ratones inyectados con 6-OHDA/En2 (figura 3A). La protección sigue siendo visible a los 7 días con el 40% y el 20% de las neuronas supervivientes en ratones inyectados con En2 y con simulación, respectivamente. (figura 3B). La inyección de En2 24 h (en lugar de 30 min) después de 6-OHDA y analizada 6 h después no mostró recuperación, lo que demuestra que la tinción de TH corresponde a la supervivencia real y no a la reexpresión de TH (figura S3F).

La apoptosis inducida por 6-OHDA es paralela a la expresión de marcadores del ciclo celular (figura S4A-D). En consecuencia, la expresión de ciclina A detectada en células TH⁺ tratadas con En2 6 h después de las inyecciones casi había desaparecido a las 24 h. (figura 3C). El rescate neuronal por En2 se asocia con la reaparición de patrones de tinción normales para H3K27me3, nucleolina y γ -H2AX (figura 4D). El porcentaje de células TH⁺ con tinción perinucleolar de H3K27me3 de "tipo natural" aumentó del 20% al 37% a las 6 horas y alcanzó el 60% y el 80% a las 24 horas y 7 días, respectivamente. El patrón de nucleolina de tipo natural tardó más en reaparecer ya que la recuperación se observó solo a las 24 h con pequeños cambios entre las 24 h y una semana. Finalmente, la disminución en el número de focos de γ -H2AX fue más lenta con una recuperación completa solo a los 7 días.

El rescate se correlacionó con un aumento significativo en la expresión de ARNm de TH y una disminución en la de ARNr pre-45S ya 6 h después de la inyección de En2 (figura 3E). La expresión de genes seleccionados relacionados con el ciclo celular y la apoptosis, que están sobreexpresados en el ratón *En1*^{+/-} o tras la inyección de 6-OHDA, se reprimió en la SNpc de los ratones 6-OHDA/En2 (figura 3E). Los análisis se realizaron a las 6 h cuando los animales inyectados con En2 y con inyección simulada todavía tenían un número similar de neuronas mDA (figura 3B).

Se expusieron neuronas del mesencéfalo E14.5 que expresan Engrailed, pero de las cuales solo el 1-2% son dopaminérgicas, a H₂O₂ con o sin En2. La figura S4E ilustra que En2 disminuye el número de DSB inducidos por H₂O₂ en paralelo con una disminución en la formación de colas de cometas que señalan daños en el ADN.

Ejemplo 6: Engrailed activa vías de supervivencia a corto y largo plazo

La protección por En2 requiere su inyección antes de las 24h. (figura S3F). Para identificar genes en esta vía de supervivencia temprana, se secuenció el ARN de SNpc de ratones 6-OHDA/simulación o 6-OHDA/En2 (6h) y se analizaron genes en las vías de remodelación de cromatina, daños en el ADN, apoptosis y ciclo celular según Pathways Studio. La figura 4A,B clasifica por orden de importancia los genes con mayores diferencias en los números

de lectura, y la figura 4C proporciona confirmación por qRT-PCR de una expresión potenciada para los genes más representativos en las 4 vías analizadas. Los genes en la vía de la apoptosis están más representados que en el ratón *En1*^{+/-} (figura 1). Esto no se debe a la inyección de *En2* per se (figura S4F), lo cual sugiere que la rápida sobreexpresión de las vías antiapoptóticas por *En2* tiene lugar específicamente después del estrés oxidativo agudo.

- 5 En analogía con la disminución de la expresión de *Gadd45b* en ratones *En1*^{+/-} de 8 semanas de edad, la adición de cicloheximida en los experimentos de rescate demuestra que *Gadd45b*, en oposición a *Pml* para el control, no requiere la traducción de una proteína intermedia y, por lo tanto, es una diana directa de Engrailed (figura 4D). La elevada inducción de *Gadd45b/g* y *NF-κB* sugiere un papel para la señalización de la quinasa N-terminal c-Jun (JNK), una vía implicada en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la EP (Coffey, 2014, Nat. Rev. Neurosci., 15, 285-299). La figura 4E,F confirma que el fuerte aumento en la tinción de p-JNK 6 h después de que la 6-OHDA es antagonizado por *En2* (figura 4F).

Ejemplo 7 : Engrailed, así como otras dos homeoproteínas, Gbx2 y Lhx9, disminuye el número de DSB inducidas por H₂O₂

- 15 Dada la alta conservación estructural y funcional de las homeoproteínas, los inventores esperaban que otras homeoproteínas tuvieran efectos similares a los de Engrailed. Por lo tanto, han comparado el efecto sobre los daños en el ADN inducidos por H₂O₂ de otras dos homeoproteínas, Gbx2 (Lin *et al.*, 1996, Genomics, 3, 335-342) y Lhx9 (Rétaux *et al.*, 1999, J. of Neuroscience, 19 (2), 783-793) en comparación con Engrailed.

- 20 Las células del mesencéfalo E14.5 se disociaron con tripsina y se cultivaron durante 6 días en medio Neurobasal suplementado con glutamina, aspartato, glutamato y mezcla de antibiótico/antimicótico en cubreobjetos de vidrio de poli-D-lisina/laminina. Luego, las células se trataron con la homeoproteína a la concentración indicada durante 24 horas y luego se expusieron durante 1 h a 100 μM de H₂O₂ y fijado en paraformaldehído al 4%. Las roturas del ADN se visualizaron con inmunofluorescencia de γH2AX. Cada punto de datos en los gráficos representa el número de focos de medianos a grandes en el núcleo de una célula. Se usaron 5-10 células por cubreobjetos y se establecieron 4 cubreobjetos por condición. No se incluyeron las células sin focos.

- 25 Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante el ensayo no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido del ensayo de comparación múltiple de Dunn.

7.1. Respuesta a la dosis para Engrailed 1 (figura 5.1)

- 30 Un tratamiento con 100 μM de H₂O₂ aumentó significativamente el número de focos de 1,9 a 8,3/célula (p <0,01). El pretratamiento con *En1* redujo el número de focos de una manera dependiente de la dosis. La dosis de 1 ng/ml (0,25 nM) redujo parcial, pero significativamente (p <0,01) el número de focos causados por H₂O₂. La dosis de 5 ng/ml (1,25 nM) y 20 ng/ml (0,5 nM) redujeron aún más el número de focos (p <0,01), pero aún eran mayores que la condición de control tratada con vehículo (p <0,01). La dosis de 100 ng/ml (2,5 nM) era indistinguible de las células tratadas con control y, por tanto, evita por completo las roturas del ADN provocadas por H₂O₂.

7.2. Respuesta a la dosis para Gbx2 (figura 5.2)

- 35 El tratamiento con H₂O₂ duplicó significativamente el número de focos de γH2AX en comparación con el control tratado con vehículo (p <0,01). La dosis de 1 ng/ml (0,027 nM) redujo parcial, pero significativamente el número de focos (p <0,01). La dosis de 20 ng/ml (0,54 nM) redujo algo más el número de focos, y la dosis de 100 ng/ml (2,68 nM) bloqueó los efectos del H₂O₂.

7.3. Respuesta a la dosis para Lhx9 (figura 5.3)

- 40 El tratamiento con H₂O₂ duplicó significativamente el número de focos de γH2AX en comparación con el control tratado con vehículo (p <0,01). La dosis de 5 ng/ml (0,022 nM) redujo significativamente el número de focos y esta reducción fue incluso mayor, pero no completa a 20 ng/ml (0,54 nM). La dosis de 100 ng/ml (2,68 nM) bloqueó completamente los efectos del H₂O₂.

Conclusión

- 45 Las homeoproteínas Engrailed se expresan en neuronas dopaminérgicas adultas de la sustancia negra. En ratones heterocigóticos Engrailed1, estas neuronas comienzan a morir a las 6 semanas, son más sensibles al estrés oxidativo y desarrollan progresivamente rasgos similares a los observados después de un estrés oxidativo agudo y fuerte que afecta a las neuronas de tipo natural. Estos cambios incluyen roturas de las cadenas del ADN y la modificación (intensidad y distribución) de varias marcas de heterocromatina nucleares y nucleolares. Engrailed1 y Engrailed2 son proteínas transductoras bioquímicamente equivalentes utilizadas previamente para antagonizar la muerte de neuronas dopaminérgicas en ratones heterocigóticos Engrailed1 y en modelos de ratón de la enfermedad de Parkinson.

En consecuencia, los inventores han demostrado que, después de un estrés oxidativo agudo, una sola inyección de Engrailed2 restablece todas las marcas de heterocromatina nucleares y nucleolares, disminuye el número de roturas de la cadena de ADN y protege las neuronas dopaminérgicas contra la apoptosis. Estos resultados apoyan el hecho

de que *Engrailed* no solo es capaz de prevenir el daño de las neuronas dopaminérgicas presentes en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra, sino también de rescatar estas neuronas cuando son dañadas por el estrés oxidativo.

Los niveles altos de especies reactivas de oxígeno ("reactive oxygen species", ROS) son tóxicos, en particular a nivel del ADN, donde inducen directamente DDR. En consecuencia, las neuronas con alta actividad metabólica, como las neuronas mDA de SNpc, que producen altas cantidades de ATP y ROS, tienen riesgo de degeneración. La remodelación de la cromatina y las vías de DDR están interconectadas, ya que los daños en el ADN inducen cambios en la cromatina, necesarios para dar acceso a la maquinaria de reparación del ADN. Este estudio sitúa a los genes *Engrailed* como reguladores clave de los daños en el ADN y los cambios de cromatina que acompañan a las formas crónicas y agudas de estrés oxidativo en las neuronas mDA.

El modelo crónico de *En*^{+/-} de estrés oxidativo, en el que las neuronas mDA muestran una tasa de muerte progresiva, pero más rápida que en los ratones WT, demuestra que, de forma similar a la dosis de *Otx2* en la retina adulta, la dosificación de *Engrailed* es importante en la SNpc adulta. De hecho, dado que *En1* y *En2* son bioquímicamente equivalentes, la pérdida de solo un alelo de cada cuatro es suficiente para acelerar la muerte celular. En el contexto del envejecimiento y las enfermedades neurológicas, esto sugiere que las neuronas mDA en el ratón *En1*^{+/-} envejecen más rápido y son más sensibles a la 6-OHDA, una toxina utilizada en modelos animales de EP.

La EP, incluso en sus formas familiares, se manifiesta bastante tarde en la vida, lo que subraya un riesgo asociado con la edad. Incluso si *Engrailed* no es un gen de la EP, sus propiedades antienvejecimiento podrían explicar la asociación de los polimorfismos *EN1* y el riesgo de desarrollar EP. En este contexto, cabe señalar que varios fenotipos observados en los ratones *En1*^{+/-} o en el modelo agudo de 6-OHDA recuerdan las observaciones realizadas en pacientes o modelos de EP. Por ejemplo, la pérdida de *MeCP2* en neuronas mDA de SNpc compromete la vía dopaminérgica nigroestriatal; las vías de JNK y ciclina están implicadas en la EP y se informó la difusión de nucleolina en pacientes con EP.

En un estudio anterior, se demostró que *Engrailed* protege las neuronas mDA en tres modelos de ratón de EP (Álvarez-Fischer *et al.*, 2011). El estudio fue muy diferente en el sentido de que se inyectó 6-OHDA en el cuerpo estriado y no directamente en la SNpc, un procedimiento agudo y severo que previene los efectos secundarios a largo plazo. Más importante aún, en el estudio anterior, *Engrailed* se infundió en la SNpc 3 semanas antes de la agresión estriatal y no se inyectó 30 minutos después de la inyección de 6-OHDA. Finalmente, el presente estudio, a diferencia de los anteriores, establece un papel de *Engrailed* como regulador transcripcional y epigenético y no solo a nivel de traducción de proteínas, incluso si los dos modos de acción puedan concurrir para salvar las células. Esta actividad transcripcional y epigenética es muy importante ya que sugiere que *Engrailed* puede tener un efecto duradero en la supervivencia de las neuronas mDA. Además, el presente estudio, a diferencia del anterior, muestra que *Engrailed* puede ser útil para rescatar a las neuronas dopaminérgicas, no solo para prevenir su lesión inducida por estrés oxidativo.

Por tanto, se puede proponer un mecanismo basado en efectos a corto y largo plazo. Los efectos a corto plazo incluyen la traducción de ARNm que codifican proteínas mitocondriales (Álvarez-Fischer *et al.*, 2011; Stettler *et al.*, 2012) y, en particular, pero no solo, la transcripción de genes antiapoptóticos (este estudio) y la represión de la apoptosis, como ya se ha propuesto (Alberi *et al.*, 2004; Beltrán *et al.*, 2014), con un predominio, aparentemente, de las vías GADD45b/g, NF-κB y JNK. Los inventores proponen que los efectos duraderos se relacionan con mecanismos transcripcionales y epigenéticos que permiten tanto la reestructuración de la cromatina como la reparación del ADN, dos vías altamente interconectadas basadas en la regulación de los genes destacados en el estudio inicial de los inventores de la secuenciación del ARN, que compara el transcriptoma de SNpc de WT y *En1*^{+/-}.

En conclusión, los efectos protectores de *Engrailed* en modelos de EP (Álvarez-Fischer *et al.*, 2011), junto con los datos presentes, dan reconocimiento a la idea de utilizar *Engrailed* como una proteína terapéutica que actúa tanto a nivel de traducción de ARNm como de transcripción de genes directa o indirecta.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centre National de la Recherche Scientifique Institut National de la Recherche Medicale College de France

<120> Tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la edad y daños en el ADN

<130> F0644/381WO ELMA/safl

<150> EP15306482.9

<151> 23-09-2015

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 60

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido sintético

<400> 1

Arg Arg Arg Lys Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Tyr Gln Leu Leu Glu Leu
1 5 10 15

Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Arg Tyr Leu Thr Arg Arg Arg Arg Ile
20 25 30

Glu Leu Ala His Ser Leu Asn Leu Thr Glu Arg His Ile Lys Ile Trp
35 40 45

Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Asn
50 55 60

<210> 2

<211> 401

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Glu Glu Gln Gln Pro Glu Pro Lys Ser Gln Arg Asp Ser Gly Leu
1 5 10 15

Gly Ala Val Ala Ala Ala Ala Pro Ser Gly Leu Ser Leu Ser Leu Ser
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Gly Ser Ser Gly Ser Asp Gly Asp Ser Val Pro Val
35 40 45

Ser Pro Gln Pro Ala Pro Pro Ser Pro Pro Ala Ala Pro Cys Leu Pro

ES 2 895 154 T3

50	55	60
Pro Leu Ala His His 65	Pro His Leu Pro Pro 70	His Pro Pro Pro Pro 75 80
Pro Pro Pro Pro Pro 85	Pro Pro Gln His Leu 90	Ala Ala Pro Ala His Gln 95
Pro Gln Pro Ala Ala 100	Gln Leu His Arg Thr 105	Thr Asn Phe Phe Ile Asp 110
Asn Ile Leu Arg Pro Asp 115	Phe Gly Cys Lys Lys 120	Glu Gln Pro Leu Pro 125
Gln Leu Leu Val Ala Ser 130	Ala Ala Ala Gly Gly 135	Gly Ala Ala Ala Gly 140
Gly Gly Ser Arg Val 145	Glu Arg Asp Arg Gly 150	Gln Thr Gly Ala Gly Arg 155 160
Asp Pro Val His Ser 165	Leu Gly Thr Arg Ala 170	Ser Gly Ala Ala Ser Leu 175
Leu Cys Ala Pro Asp 180	Ala Asn Cys Gly Pro 185	Pro Pro Asp Gly Ser Gln Pro 190
Ala Thr Ala Val Gly 195	Ala Gly Ala Ser Lys 200	Ala Gly Asn Pro Ala Ala 205
Ala Ala Ala Ala Ala 210	Ala Ala Ala Ala Ala 215	Ala Val Ala Ala Ala 220
Ala Ala Ala Ala Ser 225	Lys Pro Ser Asp Ser 230	Gly Gly Gly Ser Gly Gly 235 240
Asn Ala Gly Ser 245	Pro Gly Ala Gln Gly 250	Ala Lys Phe Pro Glu His Asn 255
Pro Ala Ile Leu Leu Met 260	Gly Ser Ala Asn Gly 265	Gly Gly Pro Val Val Lys 270
Thr Asp Ser Gln Gln 275	Pro Leu Val Trp Pro 280	Ala Trp Val Tyr Cys Thr 285
Arg Tyr Ser Asp Arg 290	Pro Ser Ser Gly Pro 295	Arg Thr Arg Lys Leu Lys 300

ES 2 895 154 T3

Lys Lys Lys Asn Glu Lys Glu Asp Lys Arg Pro Arg Thr Ala Phe Thr
305 310 315 320

Ala Glu Gln Leu Gln Arg Leu Lys Ala Glu Phe Gln Ala Asn Arg Tyr
325 330 335

Ile Thr Glu Gln Arg Arg Gln Thr Leu Ala Gln Glu Leu Ser Leu Asn
340 345 350

Glu Ser Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Lys Arg Ala Lys Ile Lys
355 360 365

Lys Ala Thr Gly Ile Lys Asn Gly Leu Ala Leu His Leu Met Ala Gln
370 375 380

Gly Leu Tyr Asn His Ser Thr Thr Thr Val Gln Asp Lys Asp Glu Ser
385 390 395 400

Glu

<210> 3

<211> 348

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Ser Ala Ala Phe Pro Pro Ser Leu Met Met Met Gln Arg Pro Leu
1 5 10 15

Gly Ser Ser Thr Ala Phe Ser Ile Asp Ser Leu Ile Gly Ser Pro Pro
20 25 30

Gln Pro Ser Pro Gly His Phe Val Tyr Thr Gly Tyr Pro Met Phe Met
35 40 45

Pro Tyr Arg Pro Val Val Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala
50 55 60

Leu Pro Gln Ala Ala Leu Gln Pro Ala Leu Pro Pro Ala His Pro His
65 70 75 80

His Gln Ile Pro Ser Leu Pro Thr Gly Phe Cys Ser Ser Leu Ala Gln
85 90 95

Gly Met Ala Leu Thr Ser Thr Leu Met Ala Thr Leu Pro Gly Gly Phe
100 105 110

5

10

ES 2 895 154 T3

Ser Ala Ser Pro Gln His Gln Glu Ala Ala Ala Ala Arg Lys Phe Ala
 115 120 125
 Pro Gln Pro Leu Pro Gly Gly Gly Asn Phe Asp Lys Ala Glu Ala Leu
 130 135 140
 Gln Ala Asp Ala Glu Asp Gly Lys Ala Phe Leu Ala Lys Glu Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Ala Phe Ser Ala Ala Glu Ala Val Gln Ala Ser Leu Val Gly
 165 170 175
 Ala Val Arg Gly Gln Gly Lys Asp Glu Ser Lys Val Glu Asp Asp Pro
 180 185 190
 Lys Gly Lys Glu Glu Ser Phe Ser Leu Glu Ser Asp Val Asp Tyr Ser
 195 200 205
 Ser Asp Asp Asn Leu Pro Gly Gln Thr Ala His Lys Glu Glu Asp Pro
 210 215 220
 Gly His Ala Leu Glu Glu Thr Pro Gln Ser Gly Gly Ala Ala Gly Ser
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Gly Lys Asn Arg Arg Arg Arg Thr Ala Phe Thr Ser
 245 250 255
 Glu Gln Leu Leu Glu Leu Glu Lys Glu Phe His Cys Lys Lys Tyr Leu
 260 265 270
 Ser Leu Thr Glu Arg Ser Gln Ile Ala His Ala Leu Lys Leu Ser Glu
 275 280 285
 Val Gln Val Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Ala Lys Trp Lys Arg
 290 295 300
 Val Lys Ala Gly Asn Ala Asn Ser Lys Thr Gly Glu Pro Ser Arg Asn
 305 310 315 320
 Pro Lys Ile Val Val Pro Ile Pro Val His Val Ser Arg Phe Ala Ile
 325 330 335
 Arg Ser Gln His Gln Gln Leu Glu Gln Ala Arg Pro
 340 345

<210> 4

<211> 397

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

ES 2 895 154 T3

Met	Glu	Ile	Val	Gly	Cys	Arg	Ala	Glu	Asn	Asn	Ser	Cys	Pro	Phe	Arg	1	5	10	15
Pro	Pro	Ala	Met	Leu	Phe	His	Gly	Ile	Ser	Gly	Gly	His	Ile	Gln	Gly	20	25	30	
Ile	Met	Glu	Glu	Met	Glu	Arg	Arg	Ser	Lys	Thr	Glu	Ala	Arg	Leu	Thr	35	40	45	
Lys	Gly	Thr	Gln	Leu	Asn	Gly	Arg	Asp	Ala	Gly	Met	Pro	Pro	Leu	Ser	50	55	60	
Pro	Glu	Lys	Pro	Ala	Leu	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Gly	Lys	Ile	Ser	Asp	65	70	75	80
Arg	Tyr	Tyr	Leu	Leu	Ala	Val	Asp	Lys	Gln	Trp	His	Leu	Arg	Cys	Leu	85	90	95	
Lys	Cys	Cys	Glu	Cys	Lys	Leu	Ala	Leu	Glu	Ser	Glu	Leu	Thr	Cys	Phe	100	105	110	
Ala	Lys	Asp	Gly	Ser	Ile	Tyr	Cys	Lys	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Phe	115	120	125	
Ser	Val	Gln	Arg	Cys	Ala	Arg	Cys	His	Leu	Gly	Ile	Ser	Ala	Ser	Glu	130	135	140	
Met	Val	Met	Arg	Ala	Arg	Asp	Ser	Val	Tyr	His	Leu	Ser	Cys	Phe	Thr	145	150	155	160
Cys	Ser	Thr	Cys	Asn	Lys	Thr	Leu	Thr	Thr	Gly	Asp	His	Phe	Gly	Met	165	170	175	
Lys	Asp	Ser	Leu	Val	Tyr	Cys	Arg	Ala	His	Phe	Glu	Thr	Leu	Leu	Gln	180	185	190	
Gly	Glu	Tyr	Pro	Pro	Gln	Leu	Ser	Tyr	Thr	Glu	Leu	Ala	Ala	Lys	Ser	195	200	205	
Gly	Gly	Leu	Ala	Leu	Pro	Tyr	Phe	Asn	Gly	Thr	Gly	Thr	Val	Gln	Lys	210	215	220	
Gly	Arg	Pro	Arg	Lys	Arg	Lys	Ser	Pro	Ala	Leu	Gly	Val	Asp	Ile	Val	225	230	235	240

ES 2 895 154 T3

Asn Tyr Asn Ser Gly Cys Asn Glu Asn Glu Ala Asp His Leu Asp Arg
 245 250 255
 Asp Gln Gln Pro Tyr Pro Pro Ser Gln Lys Thr Lys Arg Met Arg Thr
 260 265 270
 Ser Phe Lys His His Gln Leu Arg Thr Met Lys Ser Tyr Phe Ala Ile
 275 280 285
 Asn His Asn Pro Asp Ala Lys Asp Leu Lys Gln Leu Ala Gln Lys Thr
 290 295 300
 Gly Leu Thr Lys Arg Val Leu Gln Val Trp Phe Gln Asn Ala Arg Ala
 305 310 315 320
 Lys Phe Arg Arg Asn Leu Leu Arg Gln Glu Asn Gly Gly Val Asp Lys
 325 330 335
 Ala Asp Gly Thr Ser Leu Pro Ala Pro Pro Ser Ala Asp Ser Gly Ala
 340 345 350
 Leu Thr Pro Pro Gly Thr Ala Thr Thr Leu Thr Asp Leu Thr Asn Pro
 355 360 365
 Thr Val Thr Val Val Thr Thr Val Thr Ser Asn Met Asp Ser His Glu
 370 375 380
 Pro Gly Ser Pro Ser Gln Thr Thr Leu Thr Asn Leu Phe
 385 390 395

<210> 5

<211> 20

5 <212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido sintético

10

<400> 5

tggtctctgg tacatcgaga 20

<210> 6

15 <211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

20 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 6

agcattggca accctgagaa 20

25 <210> 7

<211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

30 <220>

<223> Oligonucleótido sintético

<400> 7
 gggcctgctc aggctgt 17

 5 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 8
 gttctctgtg ggggatcctg 20

 15 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 9
 ctcgctgcat caggaagacc 20
 25
 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 10
 taagaggagc aaccgctcg 19
 35
 <210> 11
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 45 <400> 11
 gccagactat aagccctacc c 21

 <210> 12
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55
 <400> 12
 gctgcacagg gttacactc 20

 <210> 13
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 13
 ccggtggtca agactgactc 20

5 <210> 14
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 14
 ctggtgcgtg gaccagag 18

15 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 15
 ccttcttcag gtcccaggtc 20

25 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 16
 aactcagcct tgagcctctg 20

35 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 17
 attcctcttc gccgccatt 19

<210> 18
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 18
 gaggcacga tggccacttt 20

60 <210> 19
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 19
 tctctagagg aacgctgaga cc 22

 5 <210> 20
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 20
 gtagggtagc cttgaggga tt 22

 15 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 21
 cccacctgtc agaccaagt 20
 25 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 22
 35 agtcatagac cagccctgta gca 23

 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 45 <400> 23
 ctgggaactg ccaaagcaac 20

 <210> 24
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55 <400> 24
 cctccgttta ccttcgcca 20

 <210> 25
 60 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 25
 aatcgacaaa tgggacctaa tga 23

5 <210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 26
 gtaaagatcc ttccaatc tgttg 25

15 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 27
 ggtggaagac aaggaggaag 20

25 <210> 28
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 28
 35 aggaggagaa aaagccgag 19

<210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 40 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 29
 ggcccgaac atctcagg 18

<210> 30
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 30
 aaatctgtca ggctggtctg c 21

<210> 31
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 31
 ggcgtaaacg ctcgagatg 20
 5 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 32
 cttcaggtag ctggagtga c 21
 15 <210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 33
 gaccccagct tgaagagtcc 20
 25 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 34
 ctgcccaccc agttcgagtt 20
 35 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 35
 ctatccggat gttcgctcc 20
 45 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 <400> 36
 gaggtgacct atctgggggt 20
 55 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 65

<400> 37
 atagcagcag tgagtcacg 20

5 <210> 38
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 38
 gctggctaattttctgggtt tca 23

15 <210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 39
 cacagcactt gcaggaaagg 20

25 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 40
 cctgtctggg tgtgtcgatt 20

35 <210> 41
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

45 <400> 41
 cgtgtaagac attcctatct cg 22

<210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

55 <400> 42
 gcccgctggc agaacgagaa g 21

60 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 43
 tactgcttag tggccagcct 20

 5 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 44
 aggcatttgc ttgcacacac 20

 15 <210> 45
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 45
 gtactggaca gtcctcacac ca 22
 25
 <210> 46
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 46
 35 ggtggtaccc tatgcattta gc 22

 <210> 47
 <211> 20
 <212> ADN
 40 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 45 <400> 47
 agaggtcaag aagggaagc 20

 <210> 48
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético
 55
 <400> 48
 tgccactcaa cgctctttct 20

 <210> 49
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 <220>
 65 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 49
 gcgtggccag tgtaaaagca 20

 5 <210> 50
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

 <400> 50
 cgcattcttc acagatggtg t 21

 15

REIVINDICACIONES

1.- Proteína Engrailed para su uso en el tratamiento y/o la prevención de daños en el ADN en un paciente que padece la enfermedad de Parkinson,

en donde dicha proteína Engrailed se inyecta una vez en la región de la sustancia negra pars compacta (SNpc).

5 2.- Composición que comprende proteína Engrailed para su uso en el tratamiento y/o la prevención de daños en el ADN en un paciente que padece la enfermedad de Parkinson, en donde dicha composición se inyecta una vez en la región de la sustancia negra pars compacta (SNpc).

3.- Composición para su uso según la reivindicación 2, en donde dicha composición comprende otro medicamento farmacéutico seleccionado del grupo de factor de crecimiento, azúcar complejo y sirtuina.

10 4.- Composición para su uso según la reivindicación 3, en donde dicho azúcar complejo es ácido polisiálico.

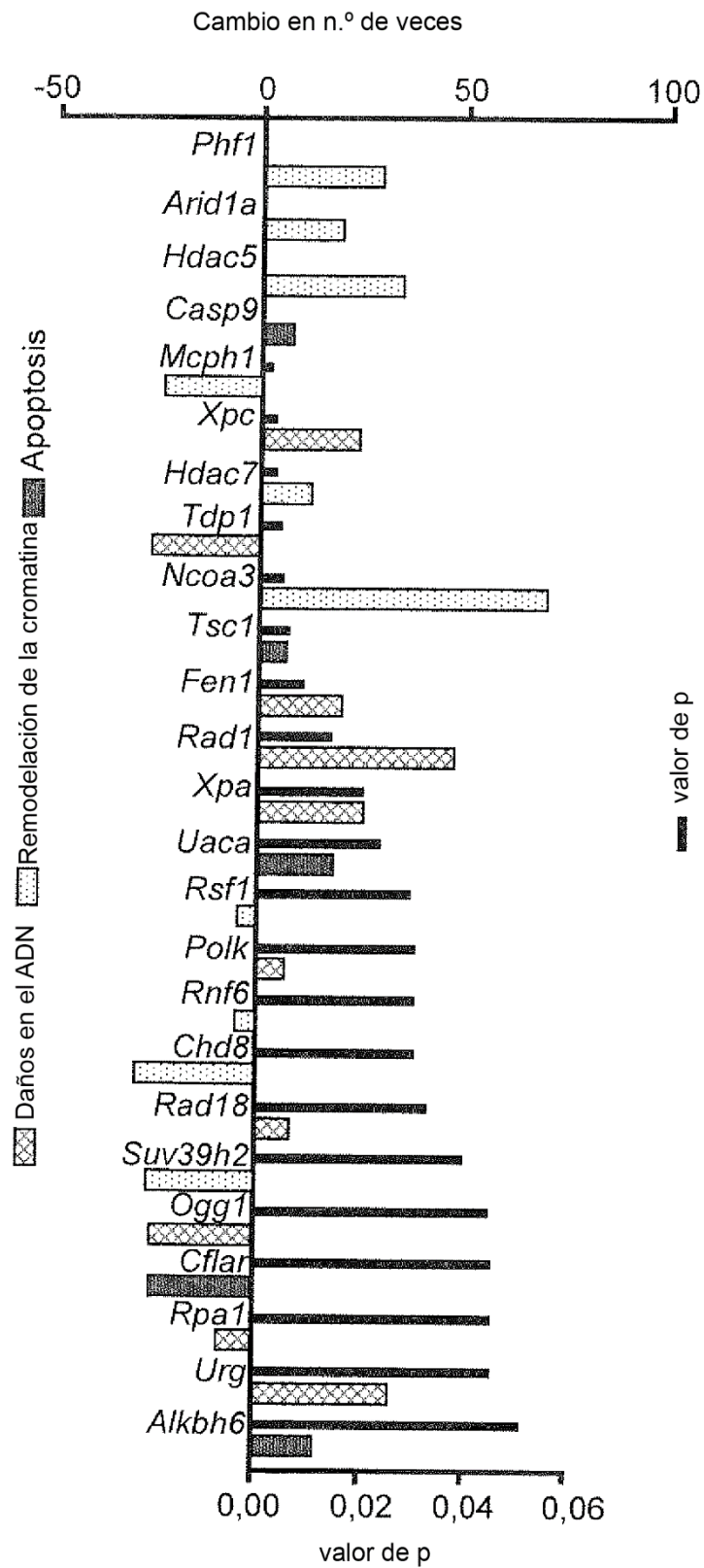


Fig. 1A

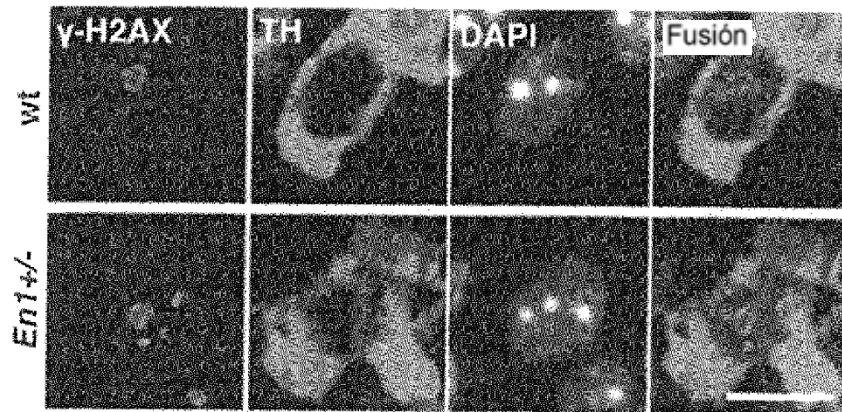


Fig. 1B

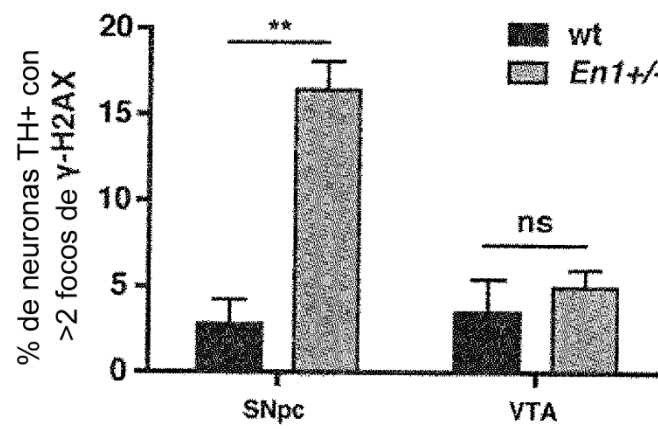


Fig. 1C

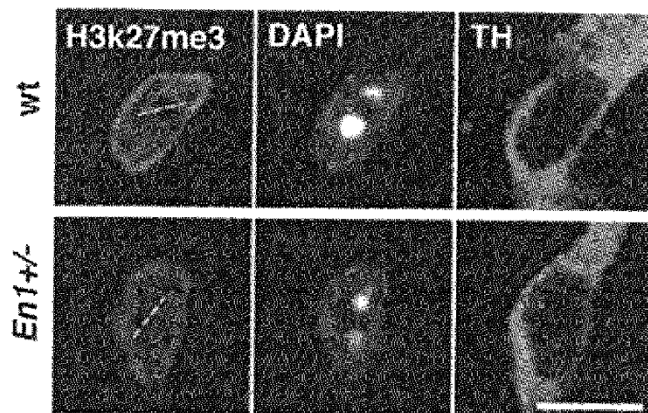


Fig. 1D

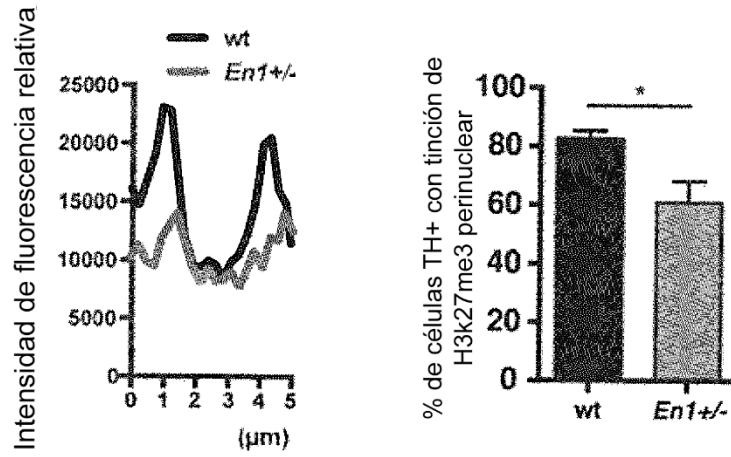


Fig. 1E

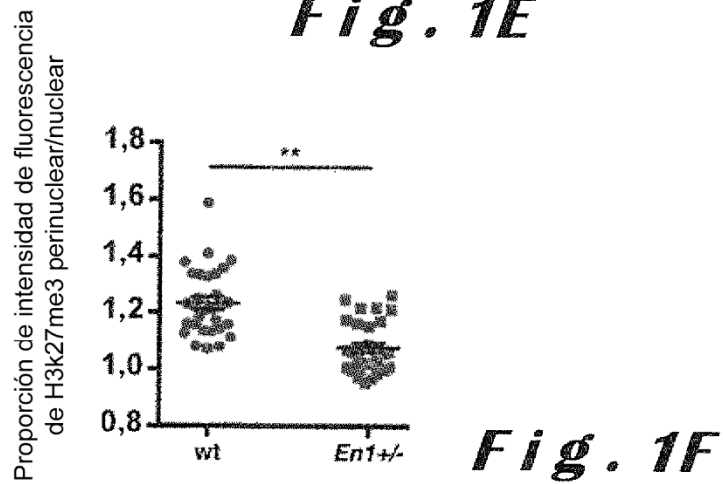


Fig. 1F

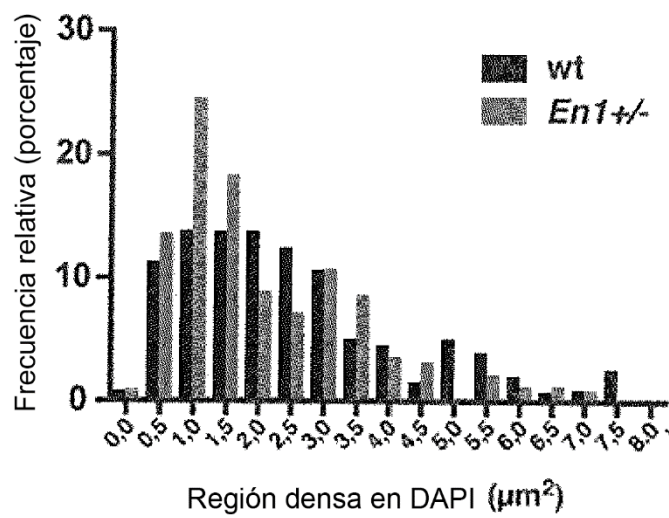


Fig. 1G

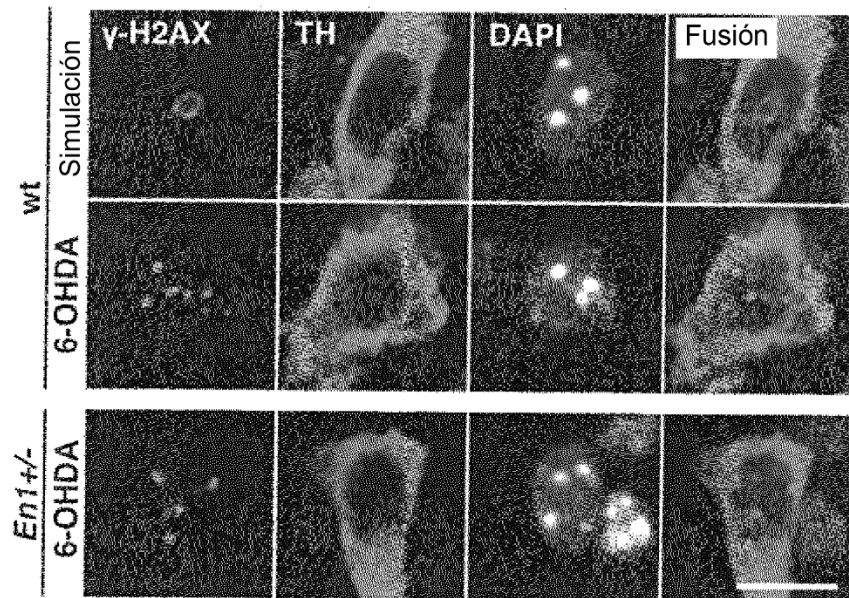


Fig. 2A

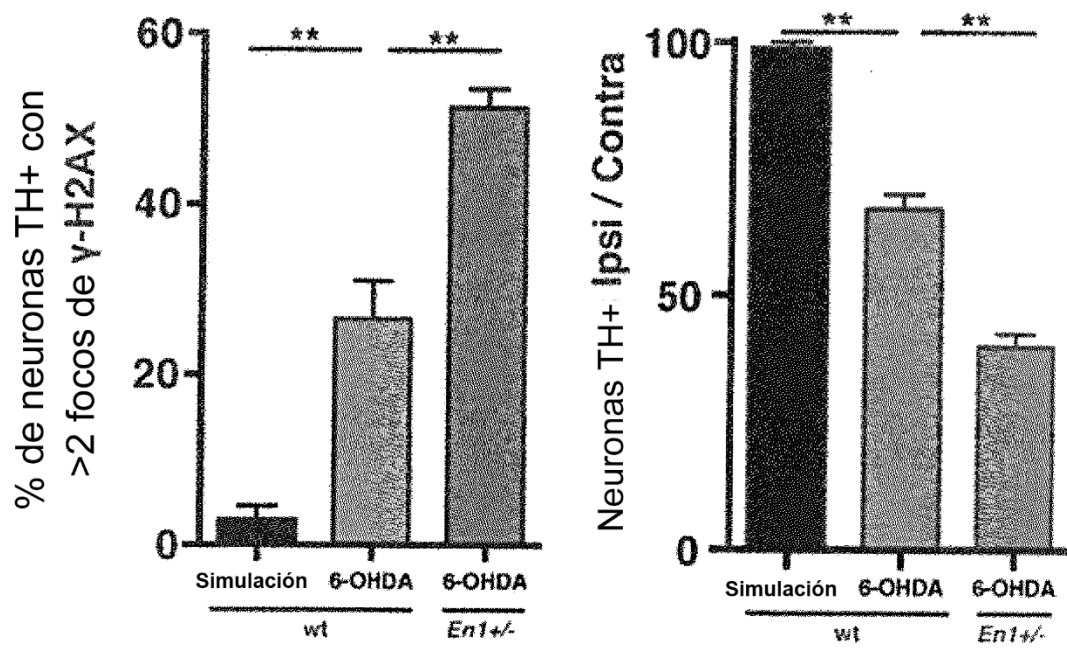


Fig. 2B

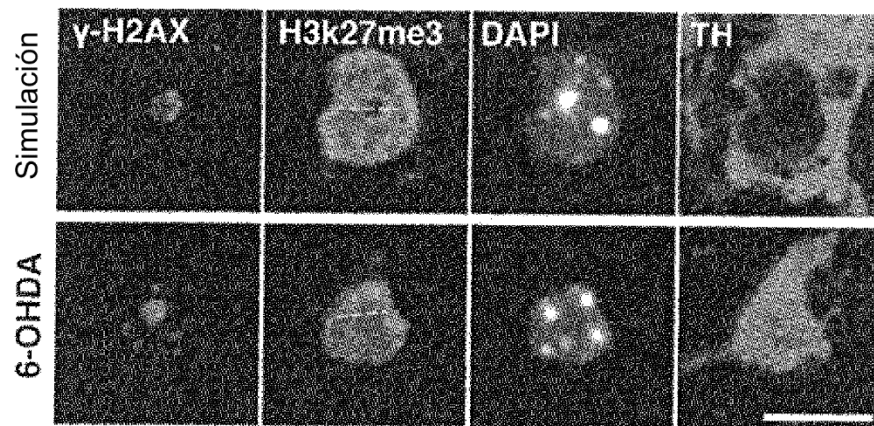


Fig. 2C

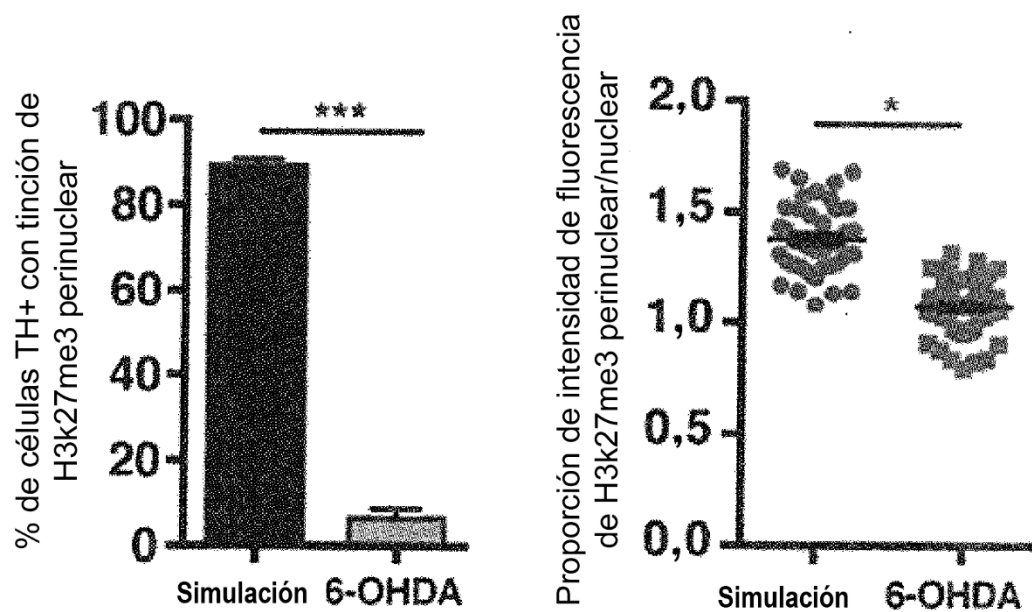


Fig. 2D

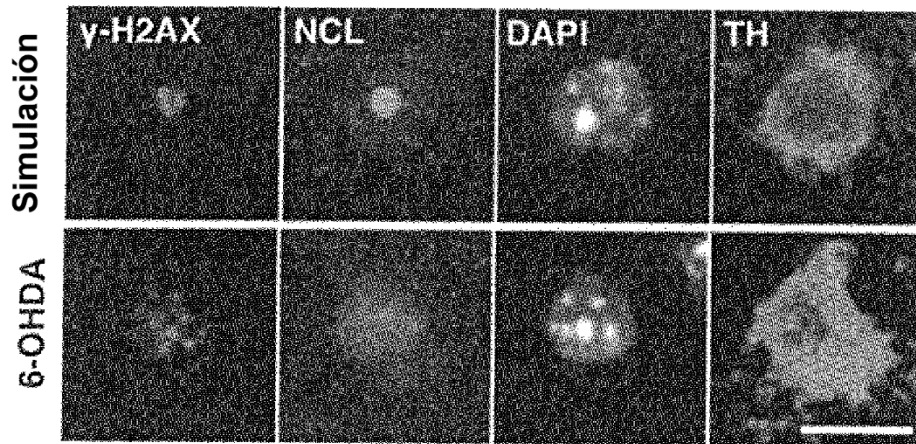


Fig. 2E

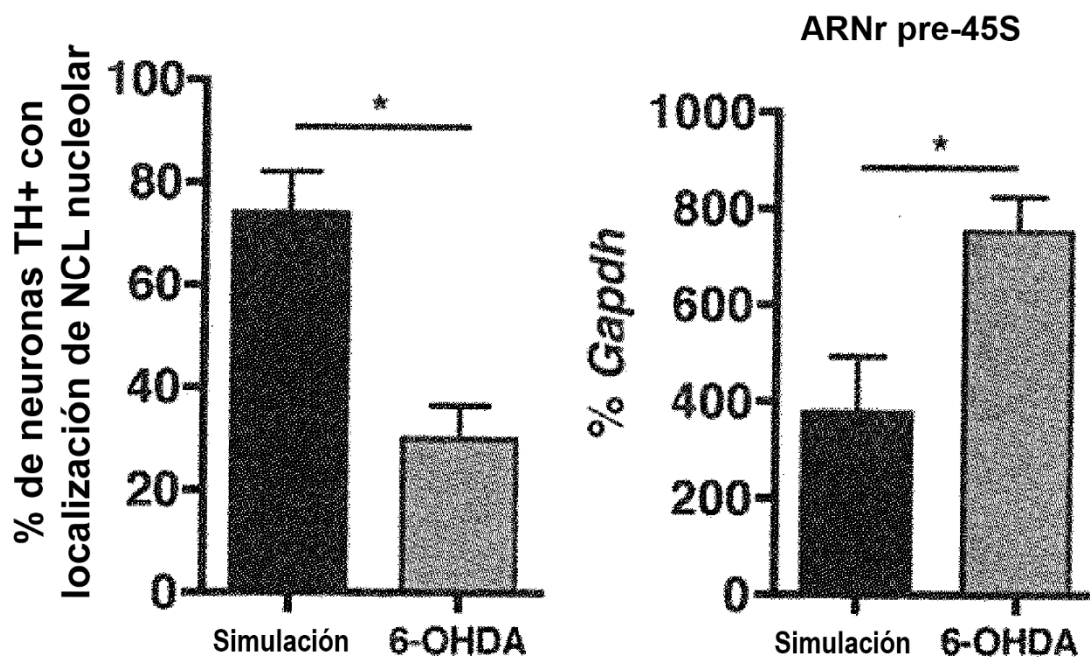


Fig. 2F

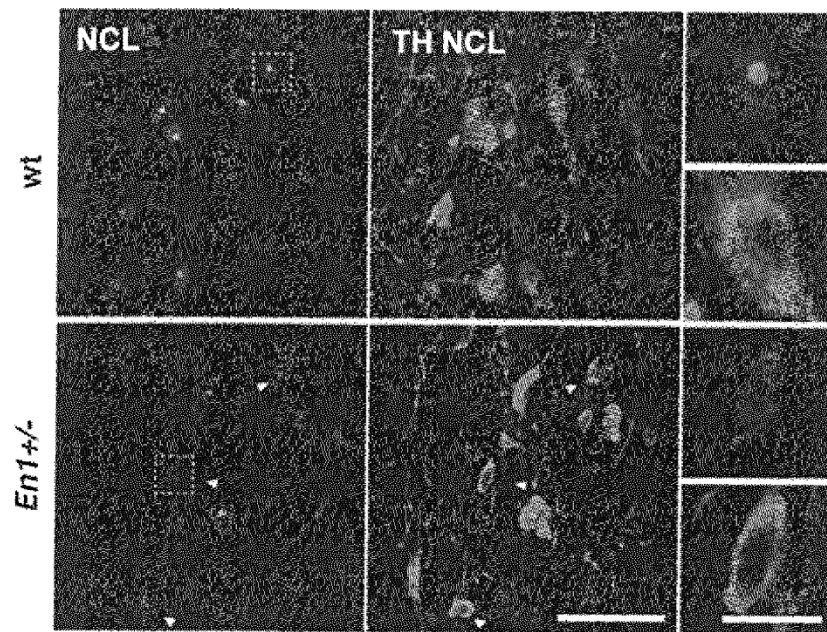


Fig. 2H

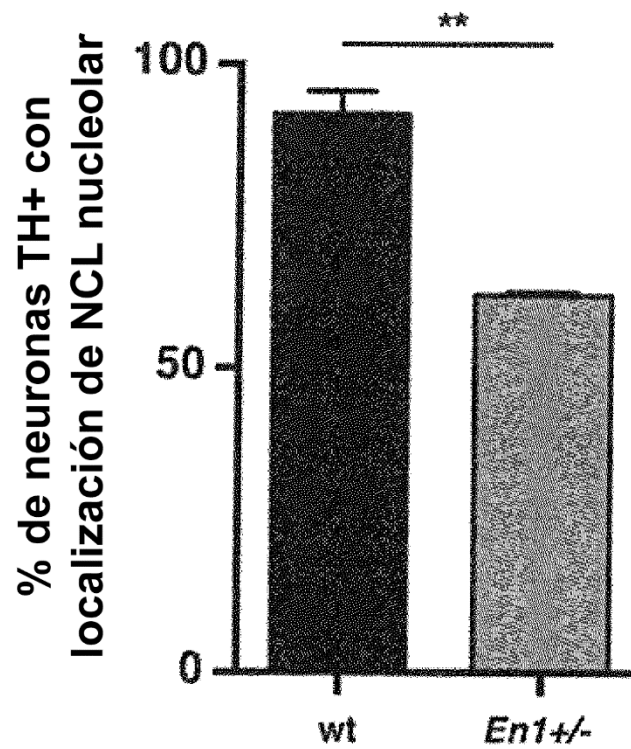


Fig. 2H

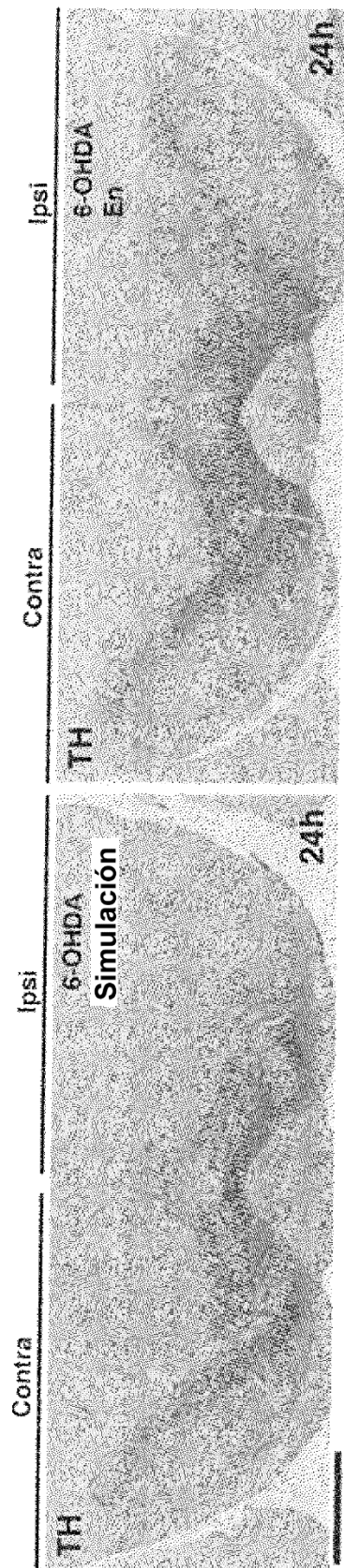


Fig. 3A

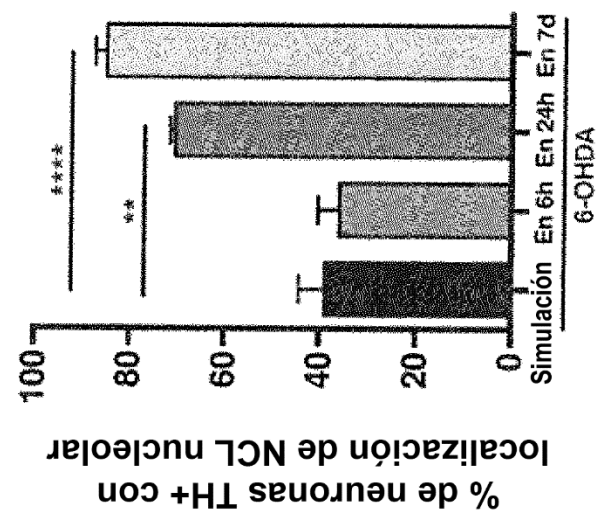
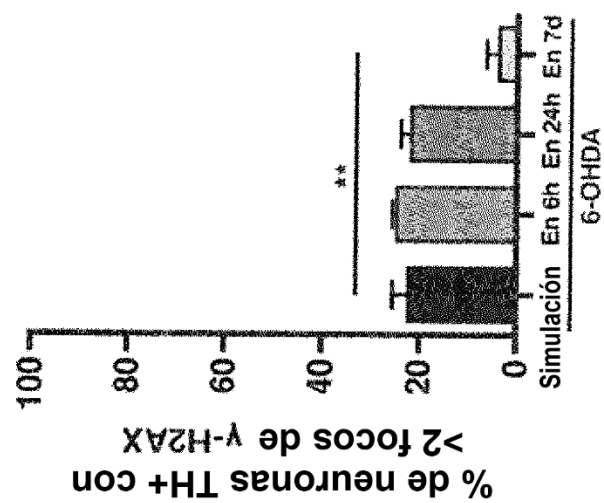
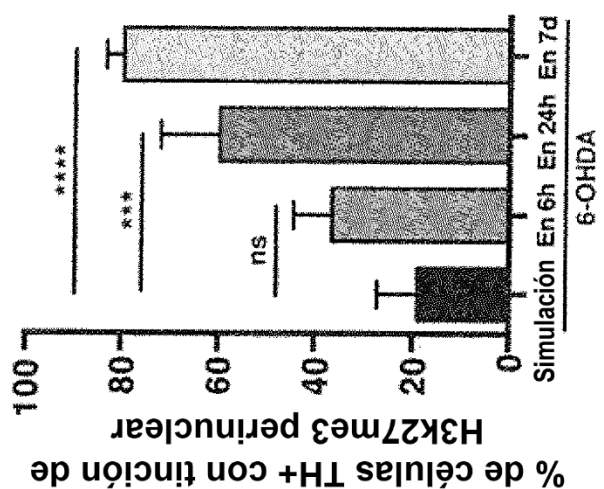


Fig. 3D



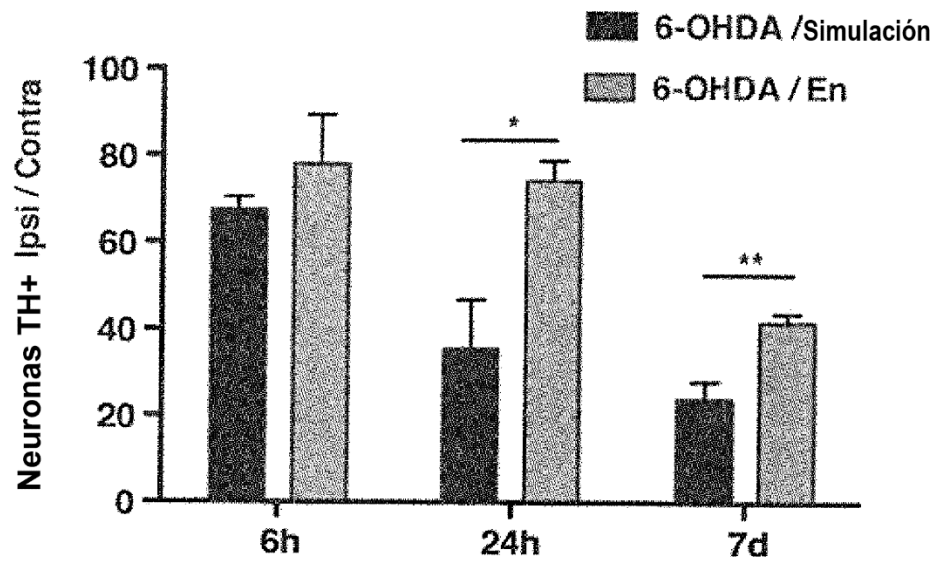


Fig. 3B

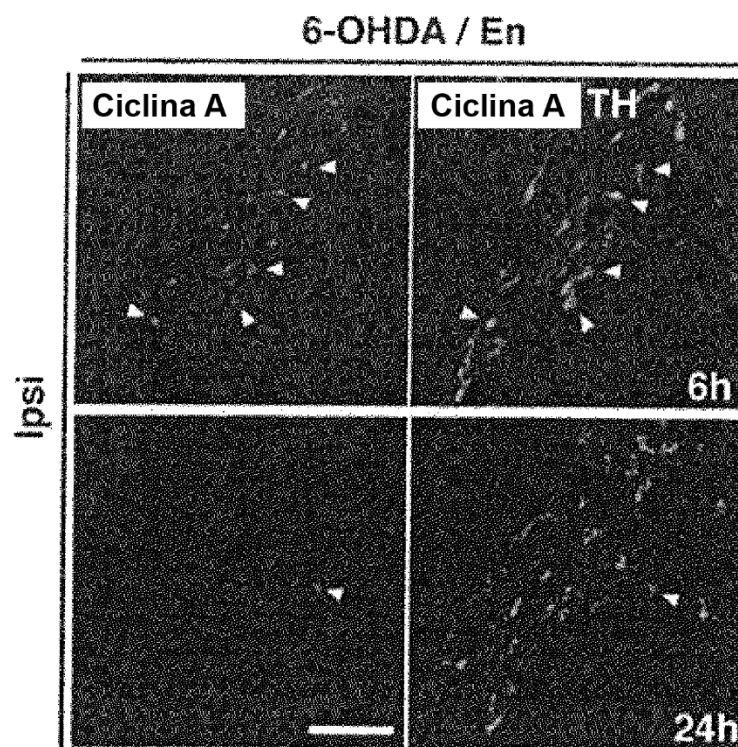


Fig. 3C

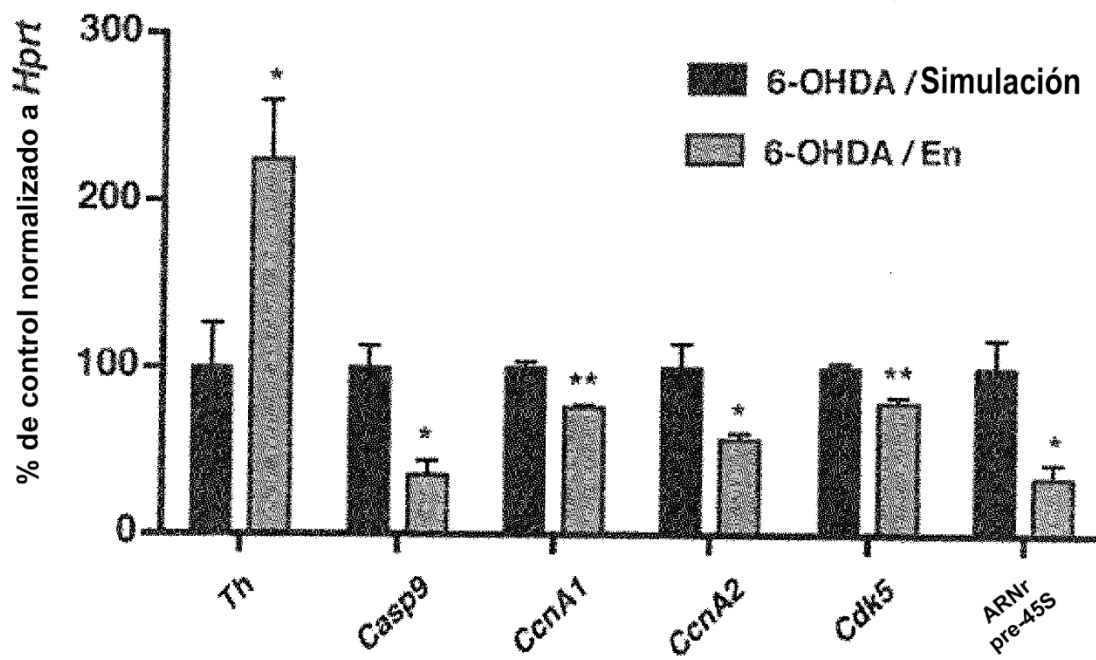


Fig. 3E

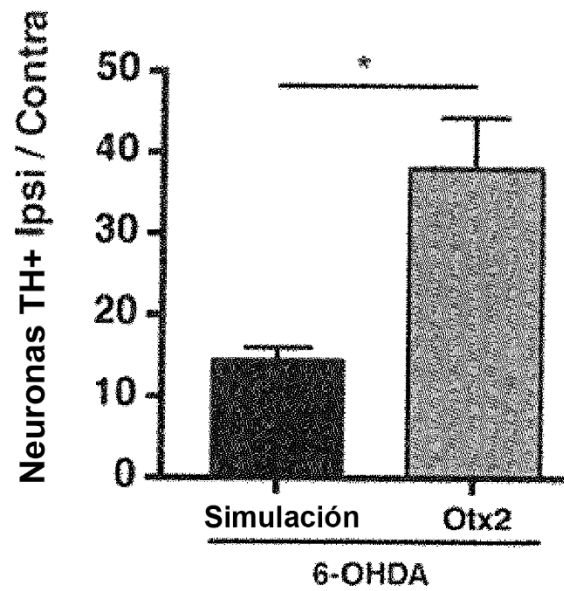


Fig. 3F

Cambio en n.º de veces (6-OHDA / En frente a 6-OHDA)

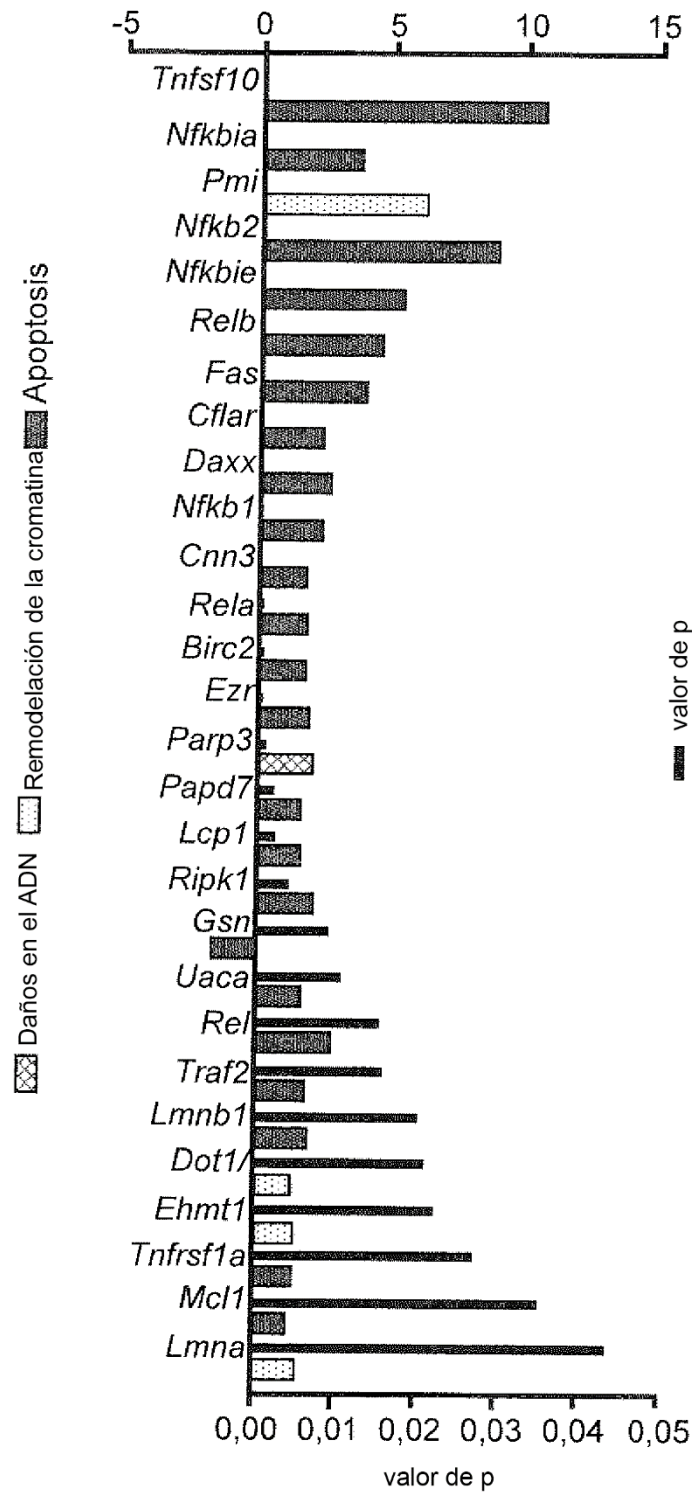


Fig. 4A

Cambio en n.º de veces (6-OHDA / En frente a 6-OHDA)

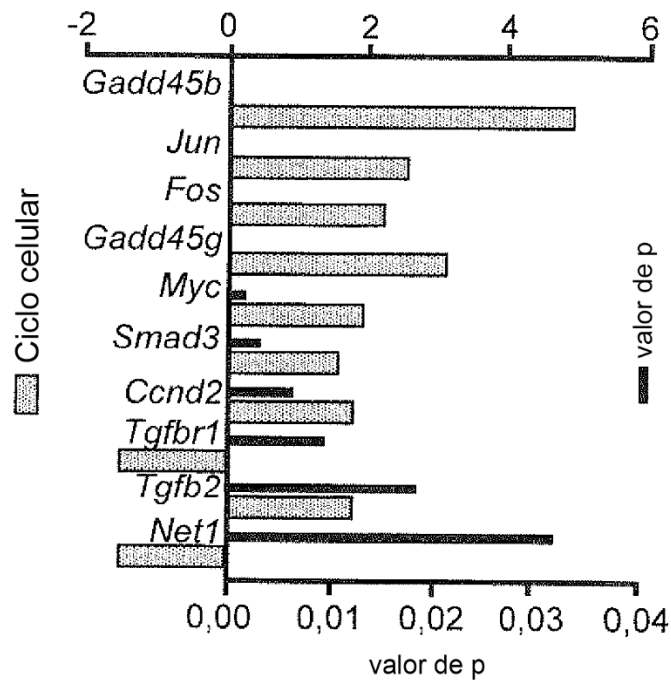


Fig. 4B

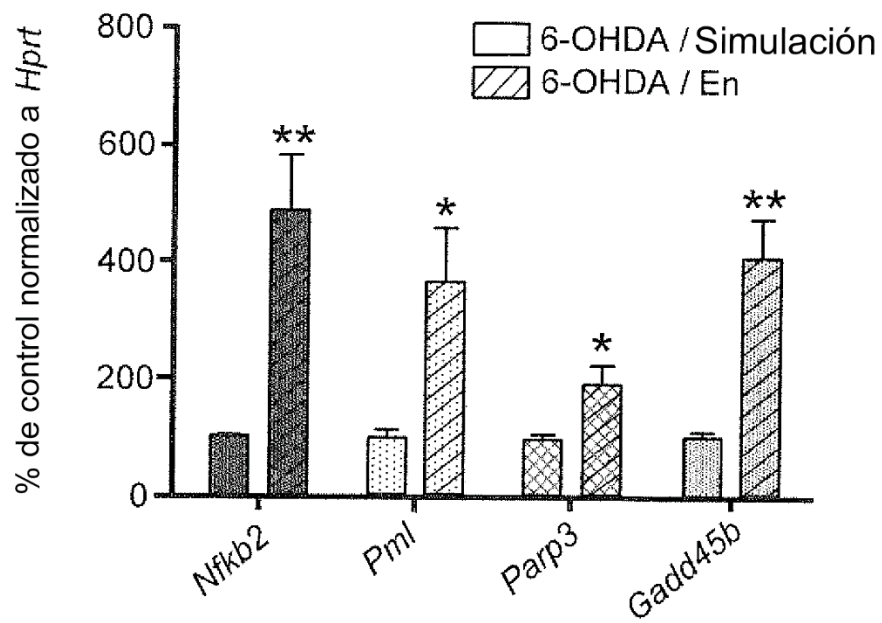


Fig. 4C

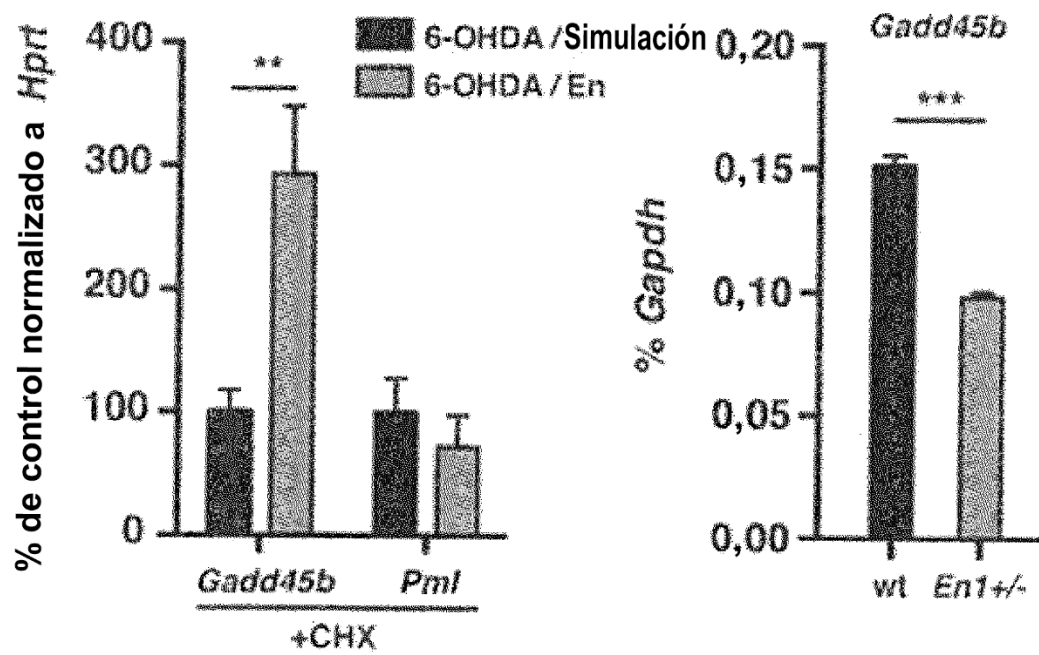


Fig. 4D

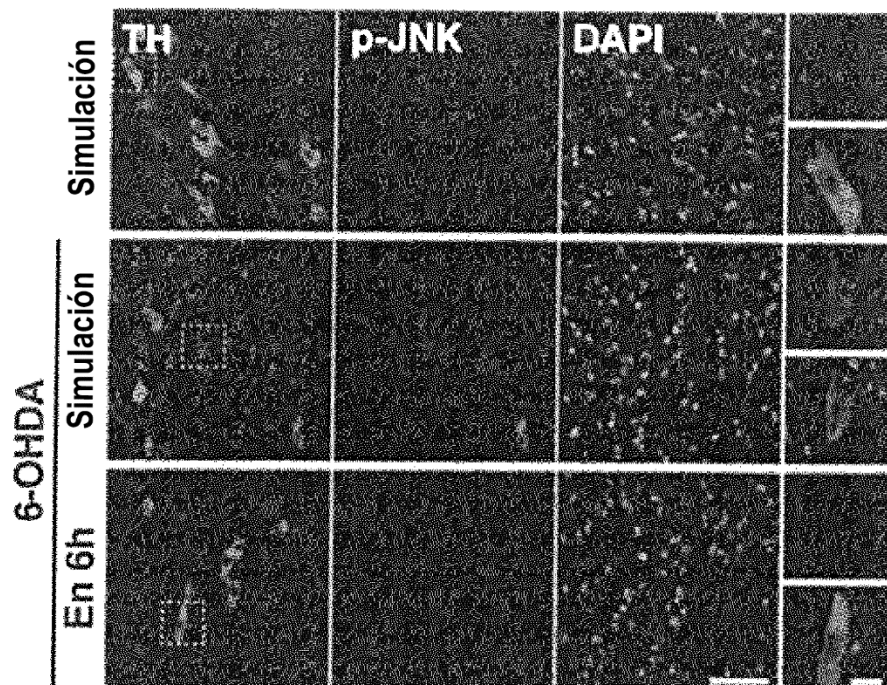


Fig. 4E

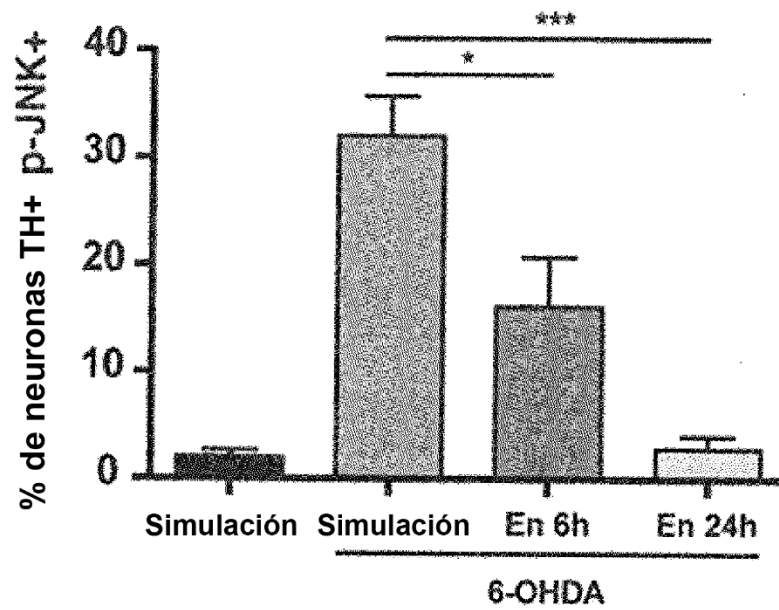


Fig. 4F

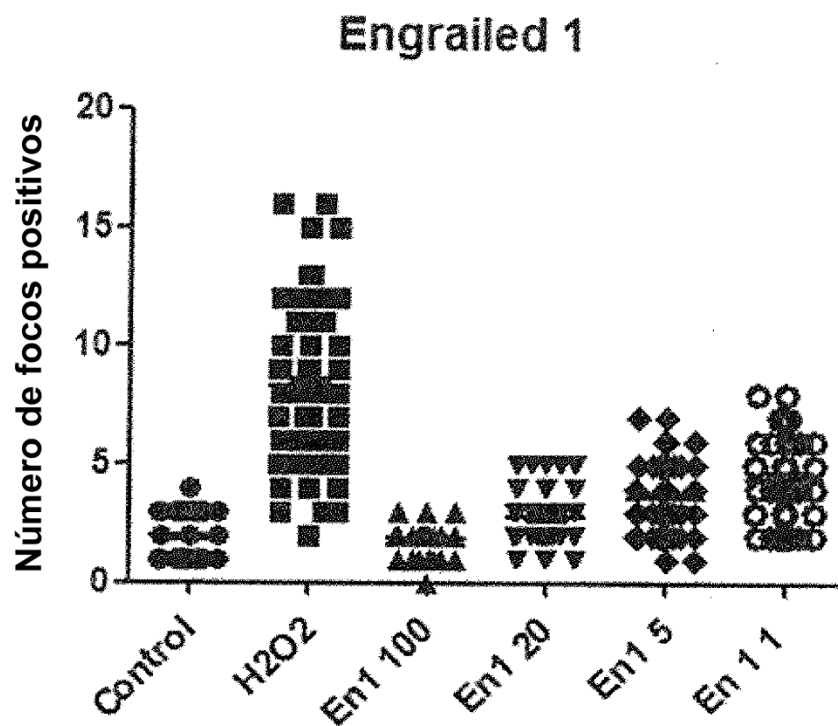


Fig. 5.1

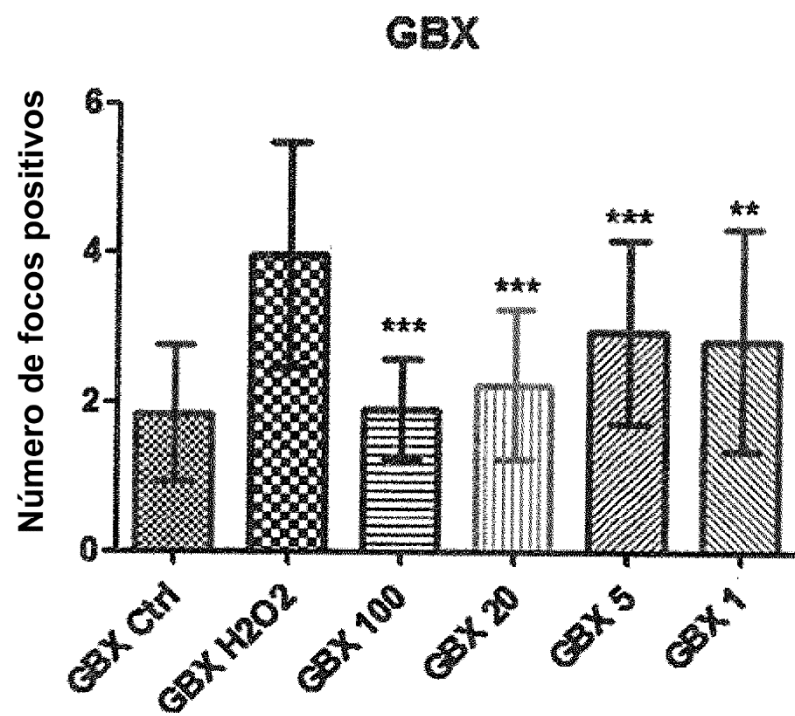


Fig. 5.2

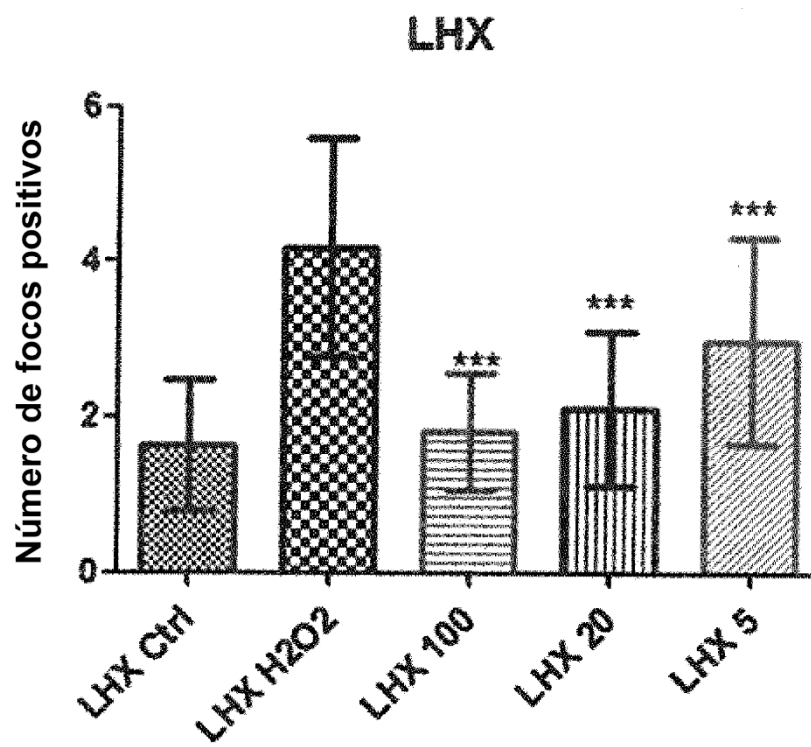


Fig. 5.3

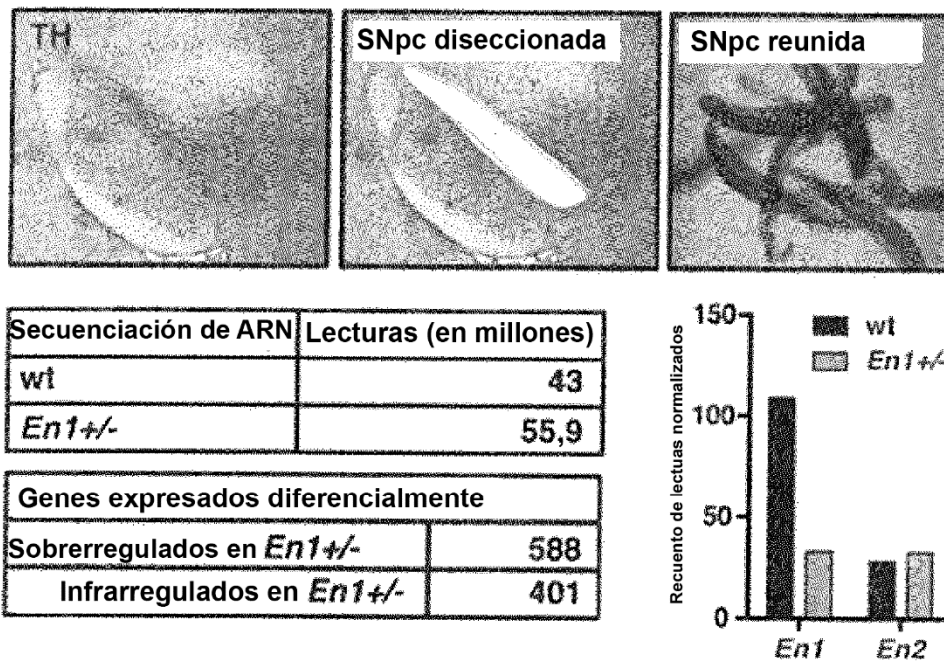


Fig. S1A

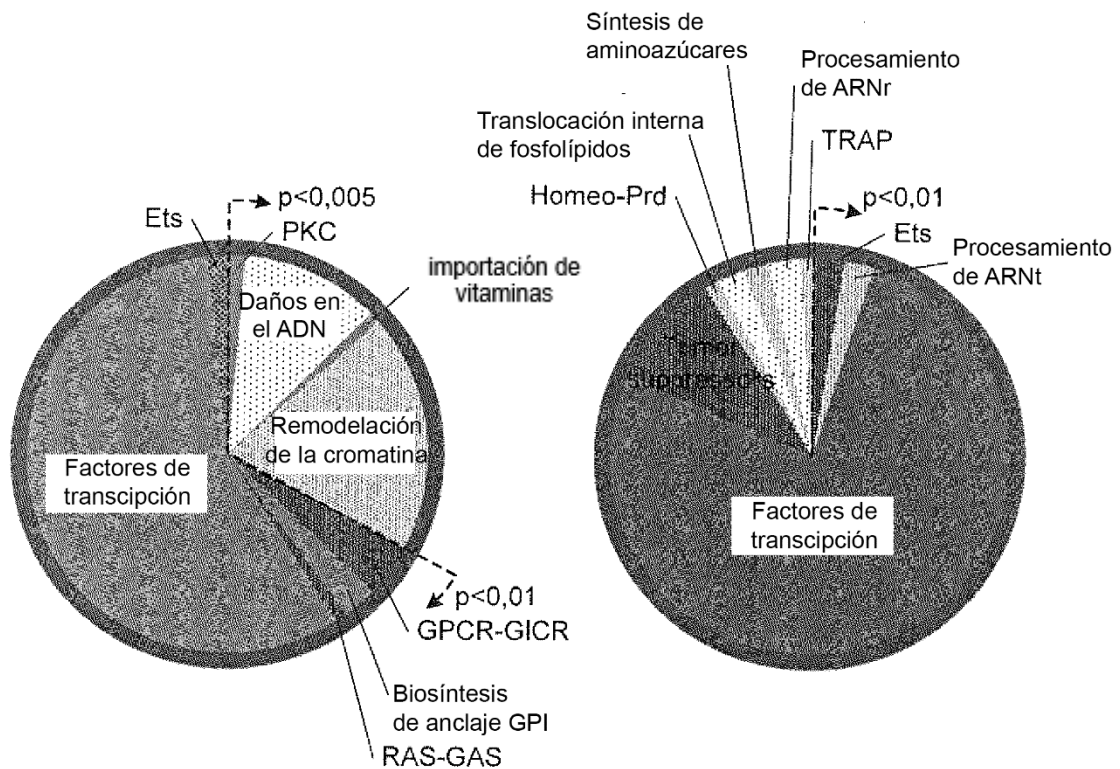


Fig. S1B

Fig. S1C

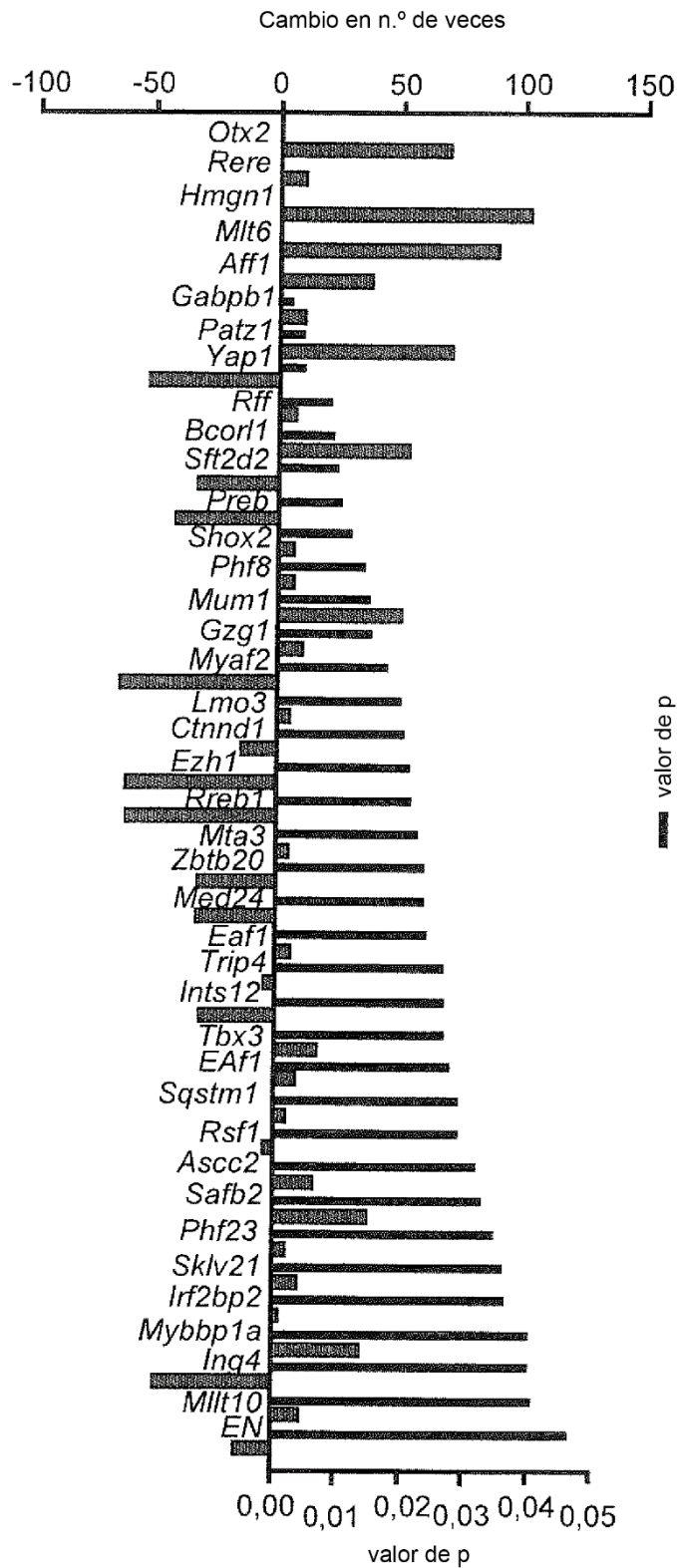


Fig. S1D

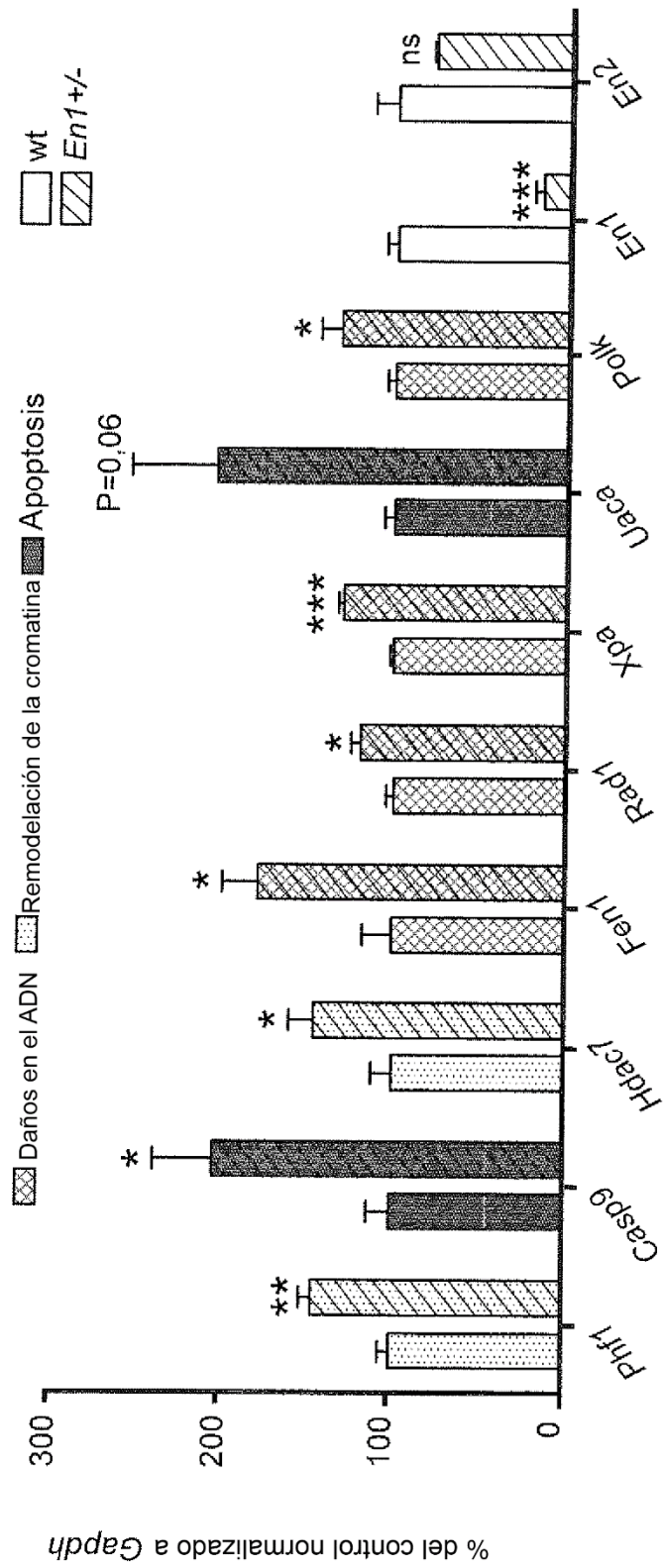
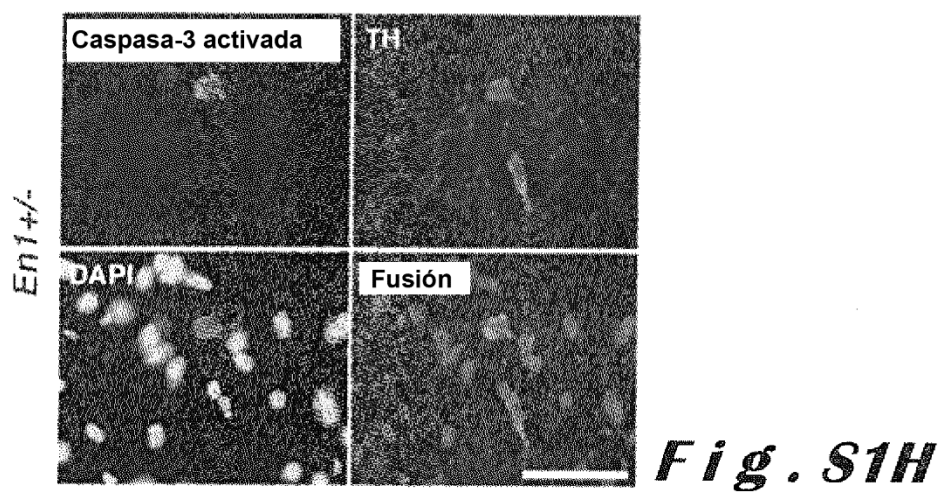
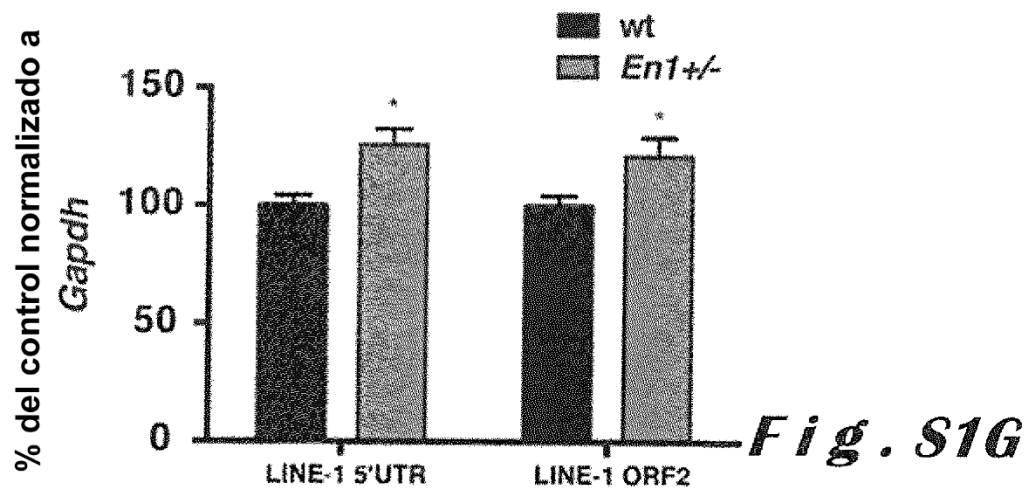
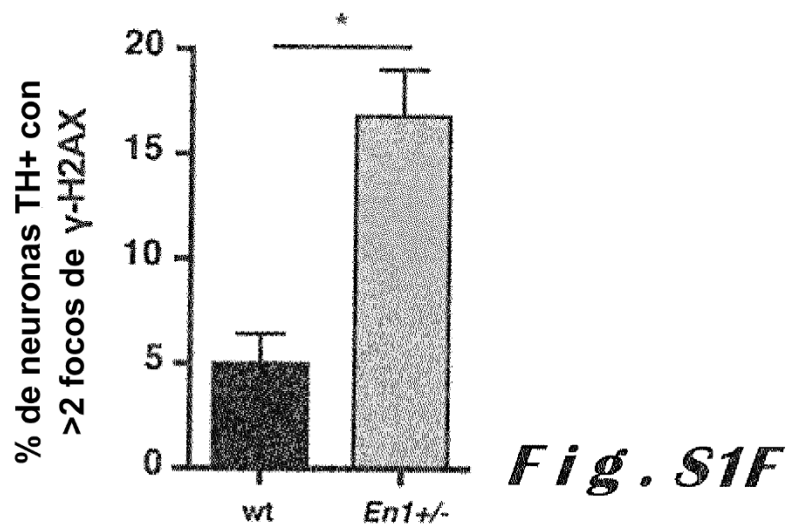


Fig. S1E



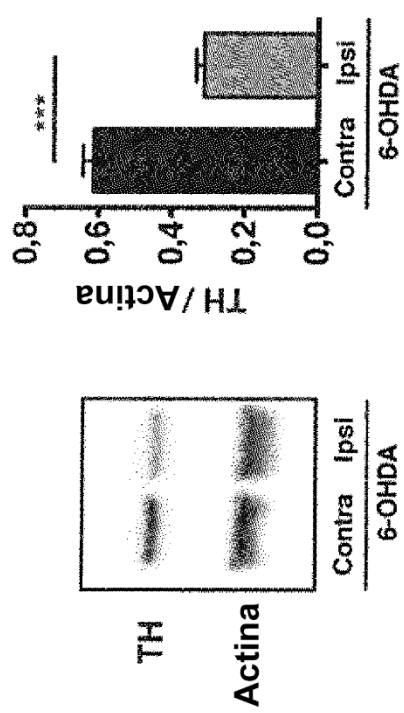


Fig. S2A

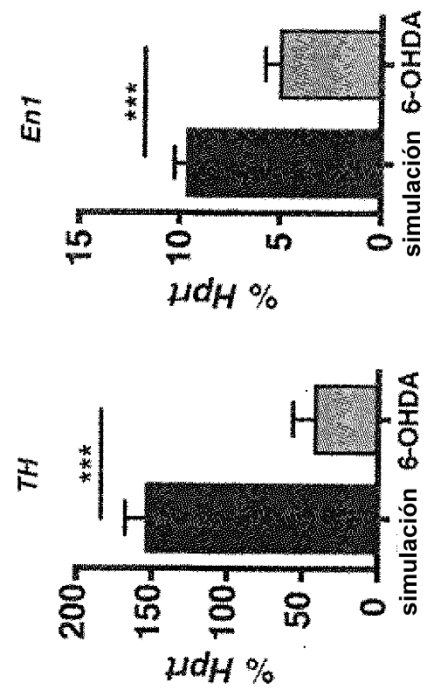


Fig. S2B

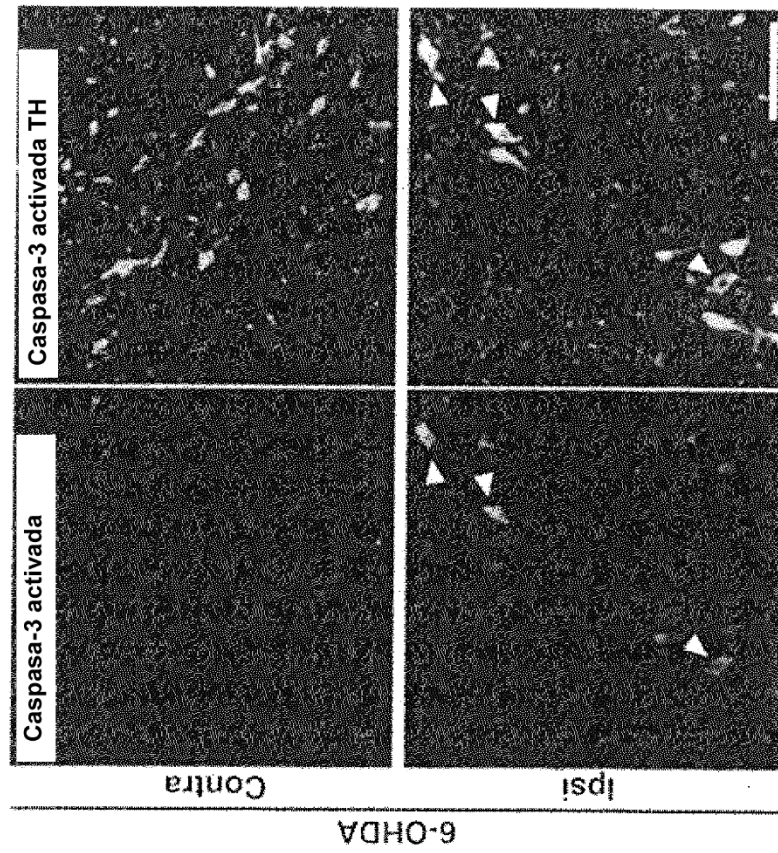


Fig. S2C



Fig. S2E

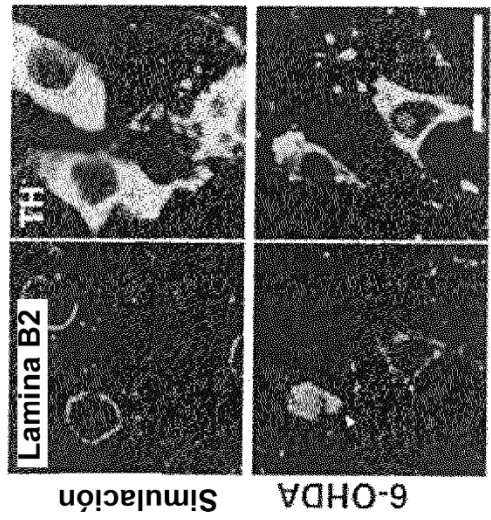


Fig. S2F

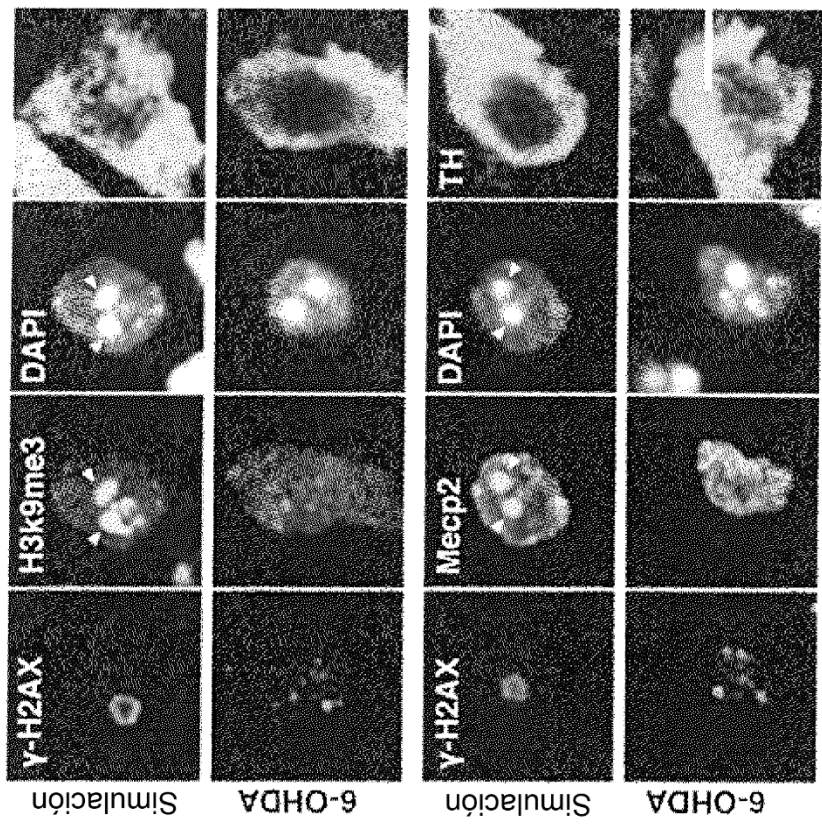


Fig. S2D

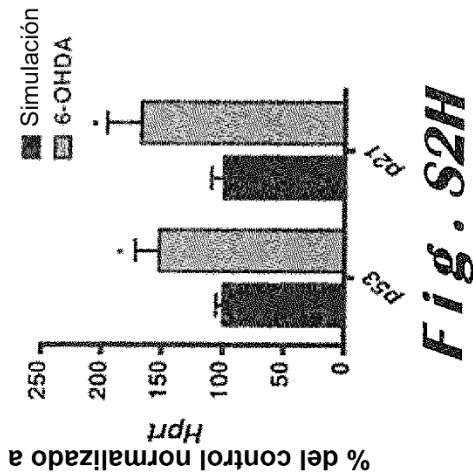


Fig. S2H

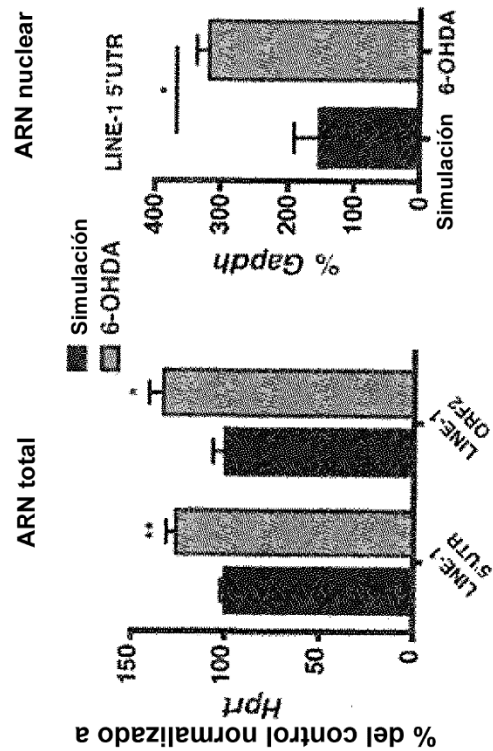


Fig. S2I

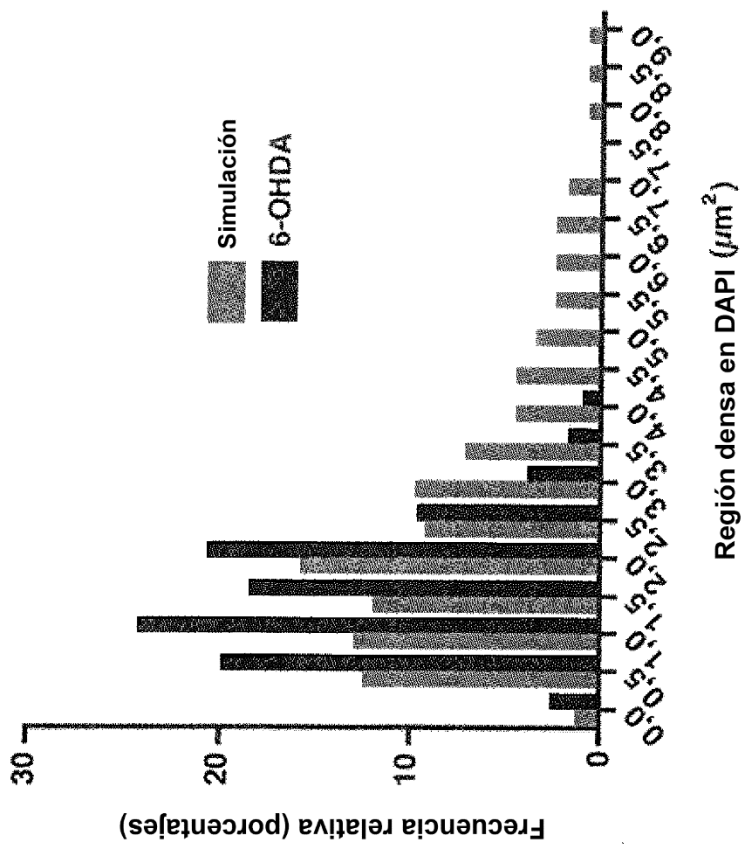


Fig. S2G

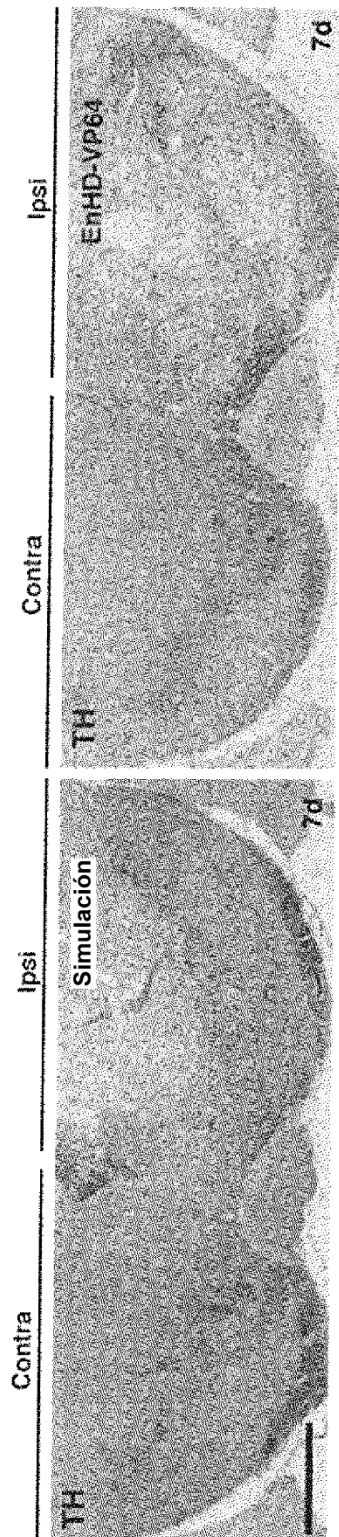


Fig. S3A

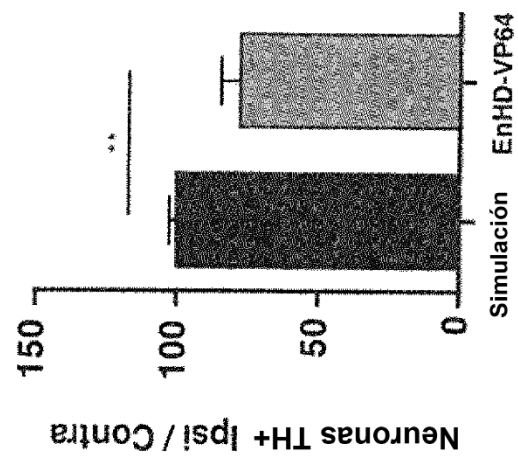


Fig. S3B

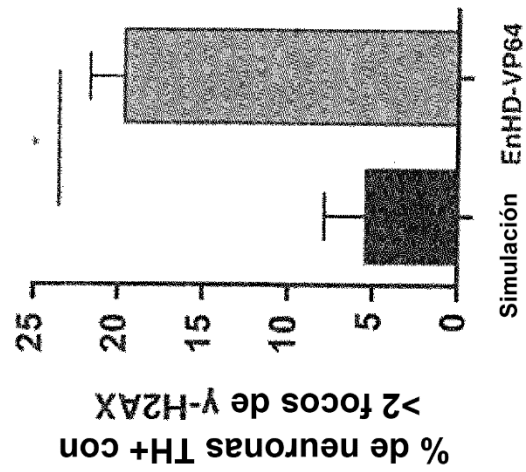


Fig. S3C

Biogénesis y organización del nucleolo

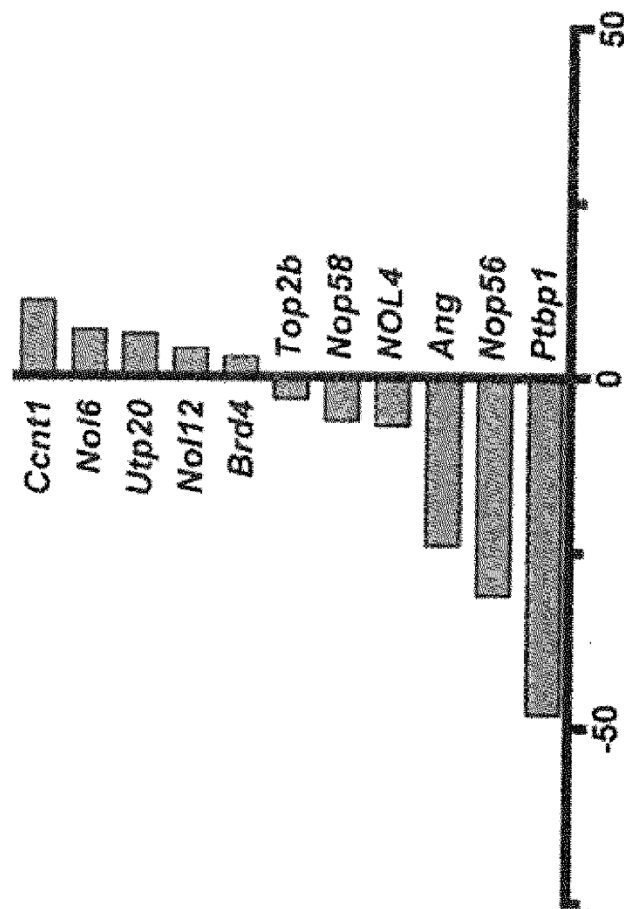


Fig. S3D

ARNr pre-45S

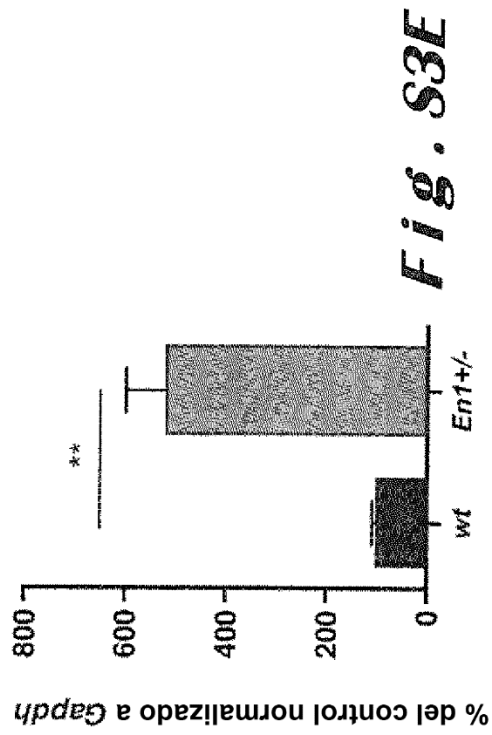


Fig. S3E

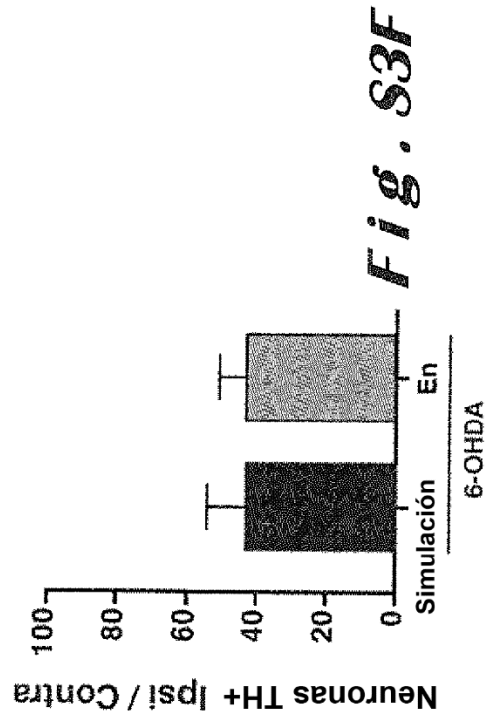


Fig. S3F

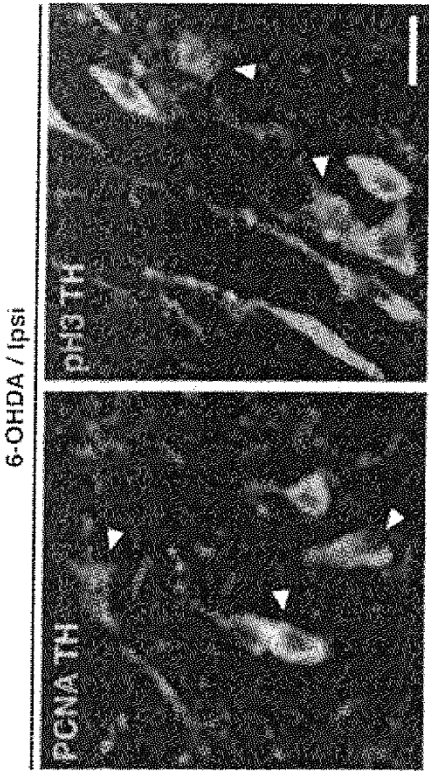


Fig. S4A

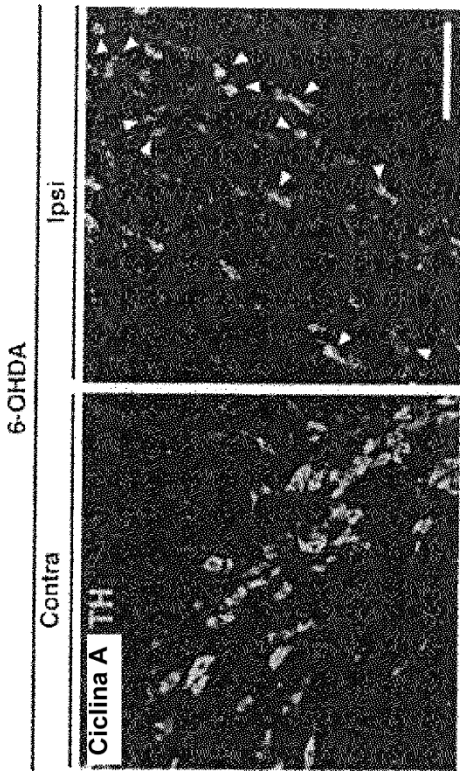


Fig. S4B

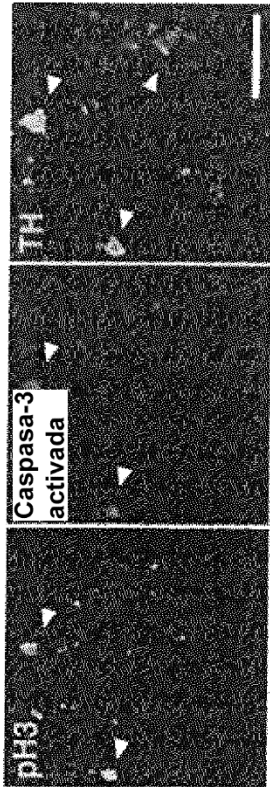


Fig. S4C

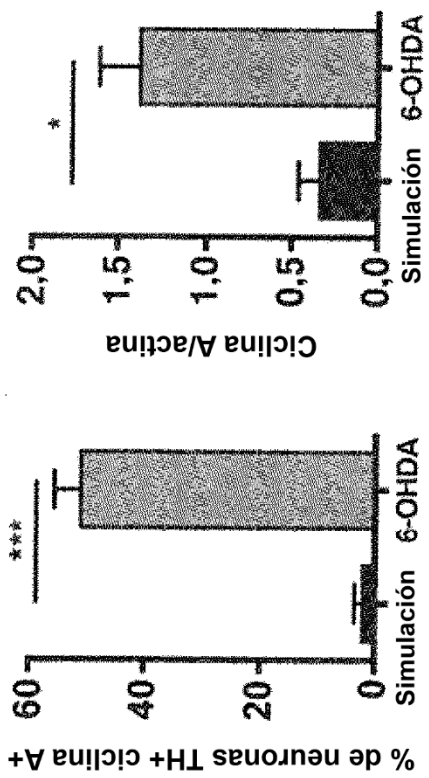


Fig. S4D

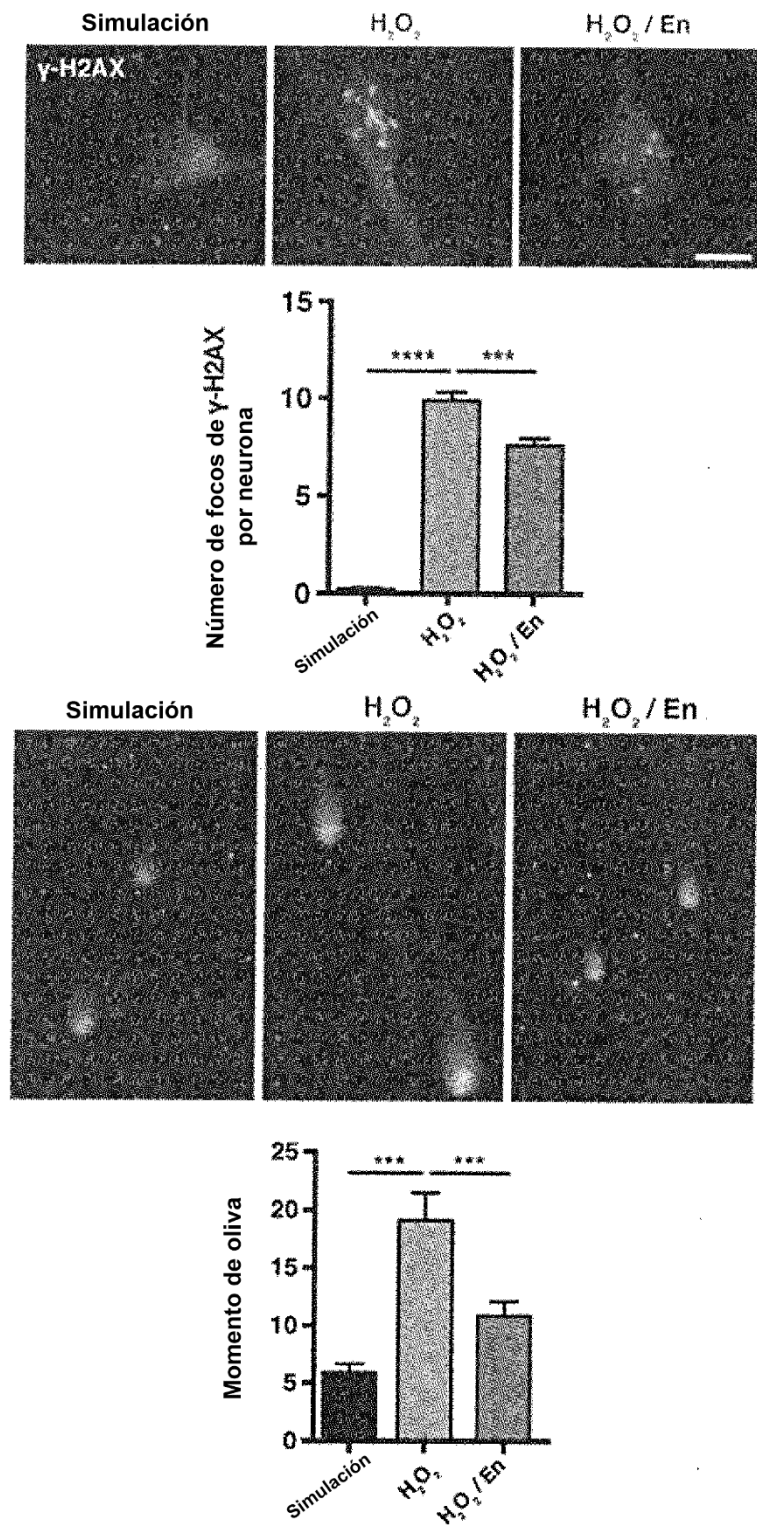


Fig. S4E

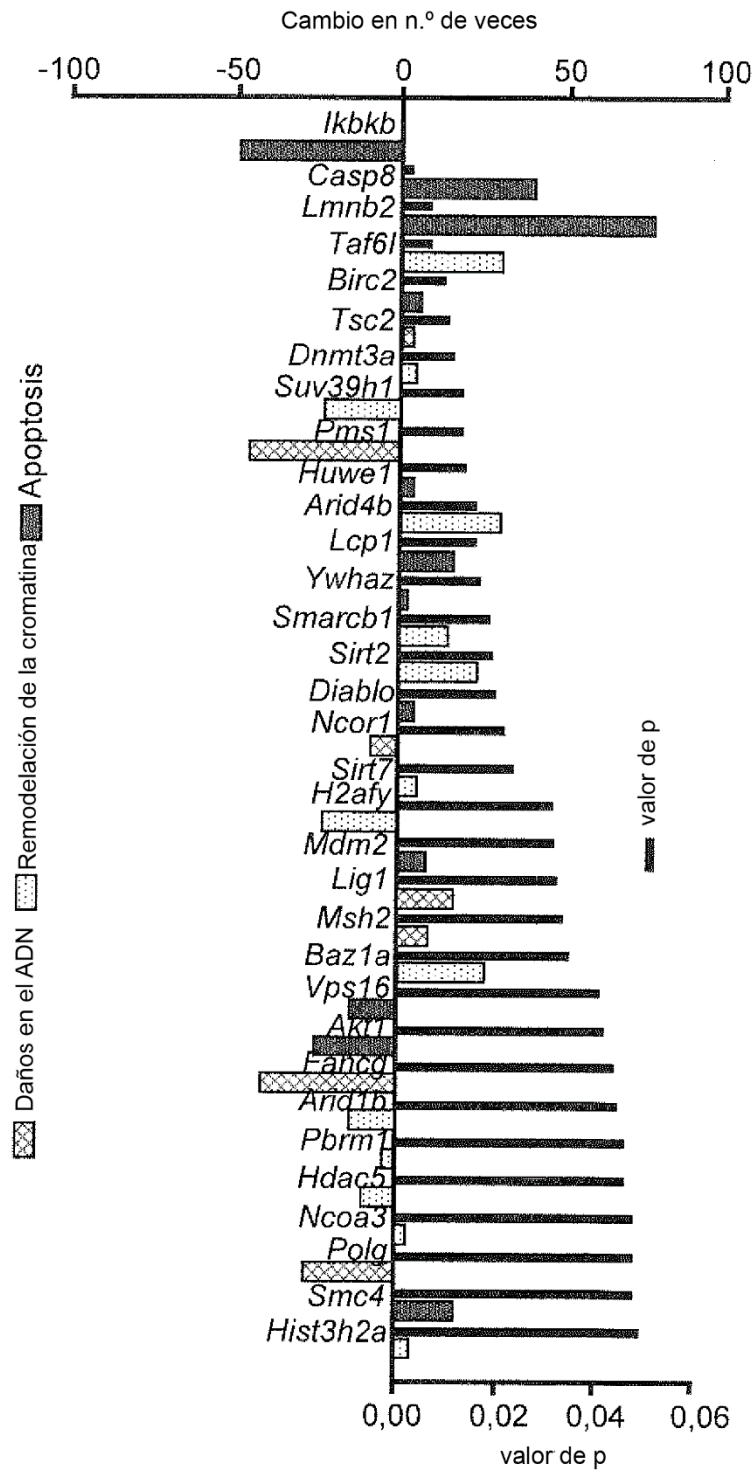


Fig. S4F